

마이크로에멀전에서 리파아제 촉매에 의한 고급지방산 모노글리세리드의 생성에 있어 최적효과

노 윤 찬 · 남 기 대 · 김 진 탁* · 조 경 행**

충북대학교 공과대학 공업화학과

*충청북도 보건환경연구원

**한국표준과학연구원

(1993년 7월 23일 접수, 1993년 12월 13일 채택)

The Optimum Effect of Long Chain Fatty Monoglyceride from Microemulsion by Lipase Catalyst

Yoon-Chan Ro, Ki-Dae Nam, Jin-Tak Kim*, and Kyung-Haeng Jo**

Dept. of Industrial Chem. Eng., College of Eng., Chung Buk Nat'l Univ.,
Cheong-Ju 300-763, Korea

*Chung Buk Institute of Health and Environment

**Korea Res. Inst. of Standards and Science, Daejun 305-606, Korea

(Received July 23, 1993, Accepted December 13, 1993)

Abstract: Mono alkyl glycerides have been obtained in good yield by enzyme catalyst from soybean oil. The reaction was carried out in an oil rich microemulsion formula. Best results were obtained with sodium bis(2-ethyl hexyl) sulfo succinate(AOT), isooctane as hydrocarbon component and buffer of pH 7. The enzyme used was a 1,3-specific lipase which leaves the 2-position intact. However, the 2-monoglyceride formed slowly undergoes long chain acyl migration to 1-mono-glyceride. Optimal reaction time at 35°C reaction temperature was found to be three hour.

1. 서 론

고급지방산 모노글리세리드는 비이온성 계면활성제의 일종으로 글리세린을 친수성기로 한 화합물이며 우수한 유화작용과 안정성을 갖고 있기 때문에 식품, 화장품 및 의약품공업에서 유화제로 널리 사용되고 있다[1-4]. 이들 모노글리세리드류는 일반적으로 화학촉매에 의한 에스테르반응으로 얻어지며 글리세롤화 및 가수분해[5]와 같은 산·알칼리 촉매 반응이나 고온이 요구되는 합성방법을 이용한다. 이

방법들은 고급지방산 모노글리세리드의 이성화반응과 디, 트리-글리세리드 등 부반응물이 생성되고 수질환경을 오염시키는 커다란 문제점을 안고 있다. 요즘에는 효소 촉매반응으로 고급지방산 에스테르류를 합성하는 여러 가지 방법[6-9]이 있으며, 보통 유기 합성보다 높은 촉매효율과 천연적 촉매에 의한[10] 고유의 선택성 때문에 보다 순수한 생성물을 얻고 있다. 글리세린 내에서 고급지방산의 활성화에 의존하는 리파아제들은 비특이성이나 1,3-특이성으로 분류된다. 효소분자에 의한 각종 반응의 확산은 고정화

효소의 활성에 영향을 주고 낮은 반응온도가 요구된다[11]. 효소의 특성 중 장점은 위치특이성이므로 어떤 화합물과 반응할 때 그 위치에서 반응하고 상온, 상압하에, pH는 중성 부근에서 반응한다. 일반적인 화학반응은 고온 고압에서 반응하는데 반하여 효소반응은 구성성분이 단백질이므로 온도가 고온일 때는 성질이 변화되어 상온에서만 반응된다[12-16]. 최근에는 리파아제의 효소합성에 관한 많은 보고가 있으며 미셀계통이나 마이크로에멀전의 경우 소량의 물속에서 용해될 때 리파아제는 용매의 변위효과를 보조하는 역할을 한다. 즉 n-헥산과 같은 탄화수소계 유기용매는 기름 성분으로 사용되었고, 리파아제의 활성도는 양이온이 아닌 음이온성이나 비이온성 계면활성제에 많은 의존성을 갖고 있다[17, 18]. 비고정 리파아제 적용에 있어서 효소반응은 리파아제가 밀집된 곳에서 지질 사이의 상 경계 내 유희에 의하여 일어난다. 보통 고정된 효소(lipozyme TM)를 갖는 반응은 물-지질 계면에 일어나기 때문에 비유희 체계에서 진행될 수 있다. 또한 Dordick[19]나 Mukderjee[20]는 유기용매의 유무가 미생물 촉매인 리파아제와 유지의 조성이 당지질 미생물공업에서 중요한 부분을 차지하고 있다는 사실을 밝힌 후부터 매우 활발한 연구가 이루어지고 있다.

따라서 반응매질로서 마이크로에멀전의 사용은 트리글리세리드나 다른 지질 친유성 기질의 난용성 문제를 제거하므로 새로운 합성 가능성을 제시하였다.

즉 리파아제는 트리글리세리드의 생산에 사용될 수 있는 에스테르 교환반응에 촉매 역할을 하기 때문에 다양한 생성물을 만들고 있다[18].

화학적 촉매에 의한 유기합성은 높은 반응온도와 부생성물에 의한 환경오염이 문제가 되고 있으나, 효소촉매에 의한 유기합성은 반응온도가 낮고 환경문제에 있어서도 유리하며 합성수율도 화학적 촉매에 의한 방법보다 높다는 사실이 알려졌다.

따라서, 본 연구에 있어서는 대두유에 용매와 보조 계면활성제를 혼합하여 마이크로에멀전화시키고 리파아제를 촉매로 사용하여 모노알킬글리세리드를 효과적으로 합성하였다. 그리고 마이크로에멀전을 효과적으로 만들기 위해 3종의 보조계면활성제를 비교하였으며 용매의 선택은 탄소수 증가에 따른 모노글리세리드의 합성수율을 알기 위한 것이며 pH 및 반응 시간의 변화에 따른 합성수율을 비교함으로써 리파아제 촉매 특성을 검토하고 반응의 최적조건을 구하

고자 하였다.

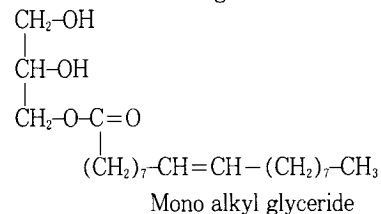
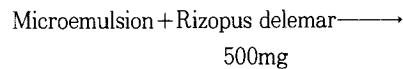
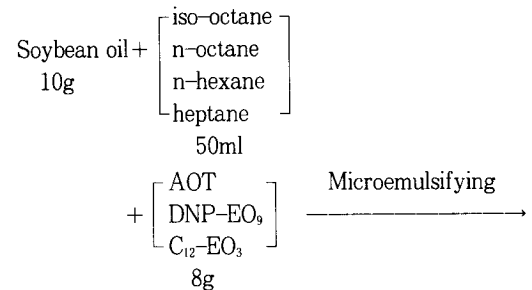
2. 실험방법

2.1. 시료 및 시약

실험에 사용된 효소 촉매인 리파아제(*Rhizopus delemar* 600)는 Sigma Chemical Co.사의 것을 사용하였고, 보조 계면활성제인 sodium bis(2-ethylhexyl)sulfosuccinate (이하 AOT로 약함), nonaethylene glycol monododecylphenyl ether(이하 DNP-EO₉로 약함) 그리고 triethylene glycol monododecyl ether(이하 C₁₂-EO₃로 약함)는 E. Merck사제 특급시약을 사용하였다. Soybean oil은 Aarhus Oliefabrik사의 것을 사용하였다. NaH₂PO₄ 0.021M로 pH 7의 완충용액을 만들어 사용하였다.

2.2. 마이크로에멀전에서의 리파아제효소에 의한 반응

본 실험은 Holmberg의[21] 방법으로 효소반응 시켰으며 개략적인 반응과정은 다음과 같다.



즉 효소반응은 순수한 고급 지방산 트리글리세리드인 대두유 10g을 n-헥산 및 보조계면활성제인 AOT, DNP-EO₉, C₁₂-EO₃를 일정량 넣고 30분간 유희시키서 마이크로에멀전이 형성된 것을 확인하였다.

35℃의 일정온도에서 리파아제의 일종인 Rhizo-

pus delemar 500mg을 가하여 16시간 동안 교반 반응시킨 후 15분 동안 90°C로 가열하여 효소를 변성시켰다. 그 후 효소를 여과하고 여액을 감압증발시켜 얻은 물질을 500ml의 클로로포름에 용해시키고 이 용액을 300ml의 4% CaCl₂ 수용액으로 미반응된 것을 추출하였다. 그리고 아실기를 정량하고자 0.5ml의 70% 과염소산을 가하고 1~2분간 교반시킨 후, 500ml의 과요드산을 첨가하여 Handschumaker [22] 및 Pohle[23]의 방법에 의하여 vicinal diol을 분석하였다.

이때 유리된 고급지방산은 0.1N KOH로 산가를 적정하였다. 이는 대두유가 소량의 유리 고급지방산을 포함하고 있기 때문에 가수분해는 출발물질에서

수행될 수 있지만 새로 얻어진 유리 고급지방산의 산가는 기존 시료에서의 산가를 제외한 것이다.

3. 실험결과 및 고찰

3. 1. 계면활성제의 선택

마이크로에멀전의 보조계면활성제를 사용하지 않고 액상을 형성할 수 있는 AOT 이외에 다른 비이온성 계면활성제 즉 C₁₂-EO₃ 및 DNP-EO₉ 등에 대한 두 상변화에 대한 상평형도를 Fig. 1에 도시하였다. 이때 탄화수소원으로 사용한 n-헥산-대두유는 일정한 비율 20:1(v/v)로 사용하였다. 즉 효소반응은 Fig. 1에 각각 A 지점으로 나타낸 조성에서 합성한다.

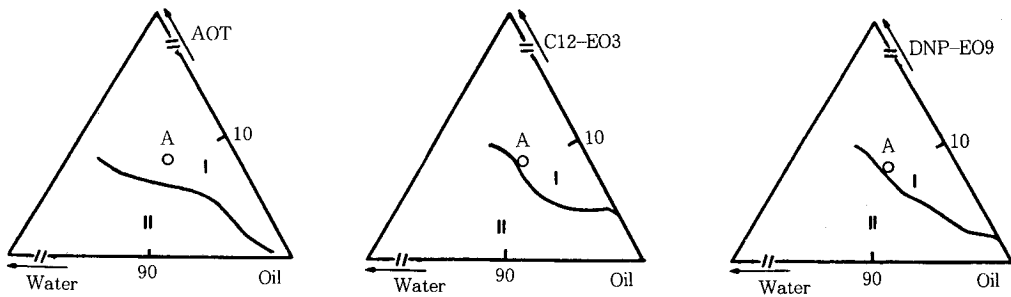


Fig. 1. Oil-rich corner of phase diagrams for the three surfactant at 35°C.

Surfactant: AOT, C₁₂-EO₃, DNP-EO₉, Component: n-hexane-soy bean oil(20:1, v/v)

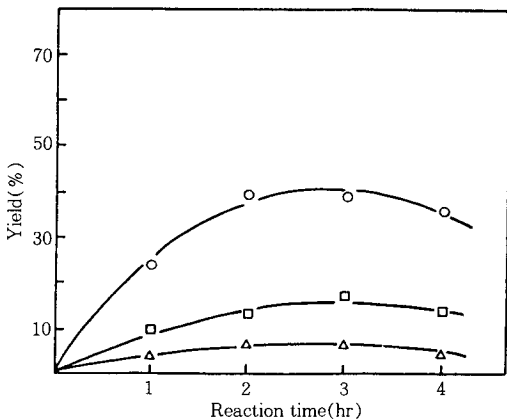


Fig. 2. Yields of long chain fatty mono glycerides on the reaction time.

Component: n-hexane-soybean oil-phosphate buffer-surfactant(93:4:5:8, w/w)
○ : AOT, □ : DNPT-EO₉, △ : C₁₂-EO₃

이 결과 합성된 수율은 Fig. 2에 나타내었다. Fig. 2에서 보는 바와 같이, 비이온성 계면활성제를 사용한 것보다 AOT를 사용한 마이크로에멀전이 효소합성에 있어 뚜렷하게 우수함을 보여주었고 그 다음이 DNP-EO₉이었다.

이는 두 개의 ethoxy화합물보다 상그림에서 물이 적은 영역에서 AOT가 나타내는 등방성 상(isotropic phase)이 보다 크기 때문에 이것이 계면활성제의 선택에 많은 영향을 주고 있음을 나타내는 것이다. 이로써 AOT를 사용한 마이크로에멀전 내에서는 효소 촉매반응이 보다 촉진됨을 알 수 있었다.

3. 2. 탄화수소계 용매의 선택

유기용매중 n-헥산, n-헵탄, n-옥탄 및 이소옥탄 등을 택하여 실험한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 35°C에서 1~4시간동안 진행된 반응에서 n-헥산, n-헵탄 및 n-옥탄에서는 효소 촉매에 용매는 탄화수소의 사슬이 긴 것이 수율이 좋았고 n-옥탄보다는 이소옥

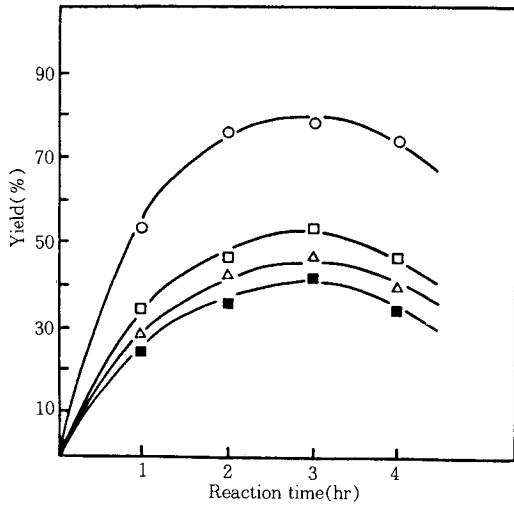


Fig. 3. Yields of long chain hydrocarbon mono glycerides on the reaction time.
 Component: solvent-soybean oil-phosphate buffer-AOT(83:4:5:8, w/w)
 ○ : isooctane, □ : n-octane,
 △ : n-heptane, ■ : n-hexane

탄의 경우가 모노글리세리드의 합성에 있어 높은 수율을 나타냈고 일반적으로 탄소수가 증가함에 따라 생성 수율이 높은 것은 마이크로에멀전 형성에 있어 소수성 부분의 친화력이 크게 되므로 접촉면적이 크기 때문에 일어나는 것으로 생각된다.

3. 3. 물과 계면활성제의 영향

계면활성제에 대한 물의 몰비율이 2~25의 넓은 범위에서 트리글리세리드에서 모노글리세리드로 전환하는 정도를 반응시간이 1시간 및 3시간 후의 결과를 Fig. 4에 나타내었다. Fig. 4에서 보는 바와 같이, 몰비율 2~25의 넓은 범위에서 모노알킬글리세리드 전환율은 그 변동률이 크지 않은 결과를 나타냈으며 물과 AOT의 몰비율이 12:1일 때 가장 최적 상태를 나타냈고 몰비율이 점점 증가할수록 오히려 전환율은 감소하는 경향이 있었다. 이것은 몰비율이 12:1 부근의 값일 때는 물과 AOT의 무게비가 1:2에 상응하기 때문에 AOT를 사용한 마이크로에멀전에서 물의 양이 증가함에 따라 열역학적으로 불안정한 유화계를 형성하여 몰비율이 증가함에 따라 오히려 전환율이 감소되는 것으로 생각된다. 한편 마

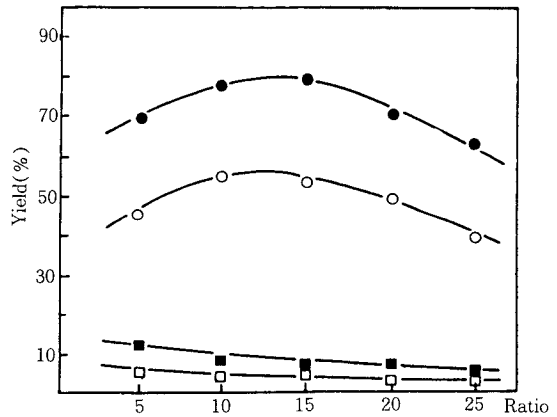


Fig. 4. Yields of long chain fatty mono glycerides on the different molar ratio of water to surfactant.
 Component: isooctane-soybean oil-phosphate buffer-AOT(83:4:5:8, w/w)
 ○ : monoglyceride(1hr), □ : glycerol(1hr)
 △ : monoglyceride(3hr), ■ : glycerol(3hr)

이크로에멀전의 R 값은 효소반응 속도에 있어서 중요하여 리파아제 효소반응의 반응속도론적 특성은 물에서처럼 AOT를 사용한 마이크로에멀전에서도 동일하다. 또한 R의 변화는 기질의 분배와 물의 활성화에 영향을 주고 두 가지 효과는 역방향의 반응속도에도 영향을 주기 때문이다. Fig. 4에서처럼 R값이 2~25에서는 트리글리세리드가 모노글리세리드로 전환하는 속도에 거의 변화가 없는데 R이 커지면 물의 활성이 증가하고 기질의 분배를 저하시킨다. 트리, 디-글리세리드와 같은 소수성 기질은 기름 영역에서 거의 완전히 분배될 것이다. 반면 리파아제는 그 내부 또는 계면에 자리잡고 있는 입자들끼리 회합될 것으로 생각된다. 또한 R의 증가는 물우물(water pools)의 내부에 위치한 효소의 보다 큰 부분과 커다란 입자를 형성하므로 효소-기질 착체의 형성을 보다 부적합하게 만든다.

3. 4. pH의 영향

효소촉매 반응에 사용된 인산염의 완충용액으로 pH 6~8 범위로 조절하고 pH의 변화에 따른 생성 수율은 Fig. 5에 도시한 바와 같다. 이 결과 완충용액에서 최적의 pH는 7 부근이었고, 그 이상과 그 이

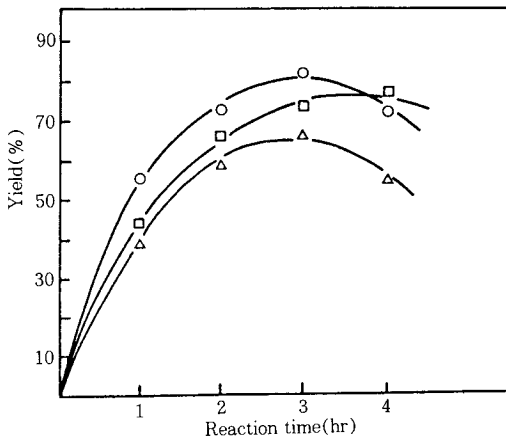


Fig. 5. Yields of long chain fatty mono glycerides vs reaction time on the buffer pH.
Component: isooctane-soybean oil-phosphate buffer-AOT(83:4:5:8, w/w)
○ : pH 7, □ : pH 8, △ : pH 6

하에서는 오히려 다소 감소하는 경향을 나타내었지만, 모노알킬글리세리드의 생성물의 변동성은 적었다. 그러나 역미셀 내부의 물에서는 산성을 띠는 것으로 알려져 있고 이것은 상 사이의 양성자와 또는 탈양성자화된 종들이 불균일하게 분포되어 사용한 완충용액의 원래 pH와 반응물의 pH와는 차이가 있으므로 반응기 내에서 반드시 최적의 pH일 필요는 없는 것으로 생각된다.

3.5. 반응시간의 영향

리파아제 촉매의 최적조건, 즉 계면활성제 AOT, 물과 물비율 12, 유기용매는 이소옥탄, 완충용액은 pH 7 및 반응온도 35°C 인 조건으로 반응시간에 따른 생성물의 수율은 Fig. 6에 도시한 바와 같다.

Fig. 6에서 보는 바와 같이, 고급지방산 모노글리세리드의 수율은 반응시간이 3시간일 때 최대치를 나타냈고 글리세린이나 고급지방산의 산출량은 지속적으로 증가하였다. 본 연구에 사용한 효소는 본래 기질의 1,3 위치로부터 지방산을 분리하여 2-모노글리세리드와 1,2-디글리세리드를 얻게 한다. 그러나 이들은 화학적으로 불안정하여 1-모노글리세리드와 1,3-디글리세리드로 아실기가 이동하게 된다. 그리고 3시간이 지난 후부터는 리파아제가 갖는 본래의 성질로 인하여 지방산과 글리세롤로 완전히 가수분해

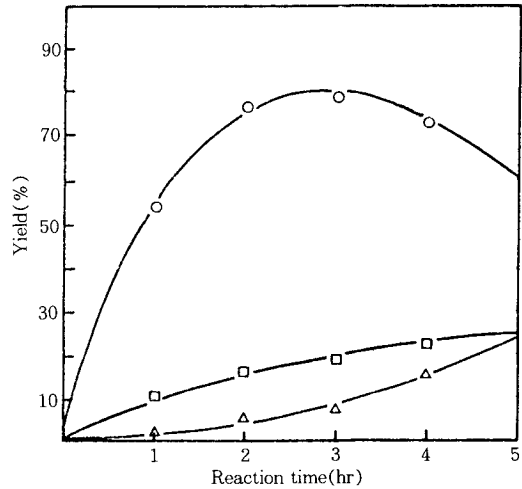


Fig. 6. Yields of long chain fatty mono glycerides on the different molar ratio in mol % based on starting triglyceride.
Component: isooctane-soybean oil-phosphate buffer-AOT(83:4:5:8, w/w)
○ : monoglyceride, □ : fatty acid, △ : glycerol

되기 때문에 시간이 경과함에 따라 지방산과 글리세롤의 양은 점차 증가하지만 모노글리세리드의 양은 감소하게 된다.

4. 결 론

마이크로에멀전에서 리파아제 촉매에 의한 고급지방산 모노글리세리드의 합성에 있어 보조계면활성제를 이용한 효소반응은 매우 좋은 수율을 얻을 수 있었다. 이 때 얻은 결과는 다음과 같다.

- 음이온성 계면활성제인 sodium bis(2-ethyl hexyl) sulfo succinate(AOT), 비이온성 계면활성제인 nonaethylene glycol monododecyl phenylether(DNP-EO₉)와 triethylene glycol monododecyl ether(C₁₂-EO₃)를 각각 마이크로에멀전화하였을 때 유기용매 내에서 효소반응은 AOT가 가장 좋았다.

- n-헥산, n-헵탄, n-옥탄 및 이소옥탄을 사용하였을 때 탄화수소의 탄소수가 증가할수록 리파아제의 효소촉매반응의 수율이 증가하였고, 탄화수소가 동일한 것 중에는 이소옥탄 이성질체가 우수하였다.

- 보조계면활성제인 AOT와 이소옥탄을 사용하였을 때 최적조건은 pH 7, 반응온도는 35°C, 반응시간

은 3시간이었다.

참고문헌

1. S. N. Zlatanos, A. N. Sagredos, and V. P. Papaglorgiou, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **62**, 1575 (1985).
2. T. N. Kumar, Y. S. R. Sastry, and G. Lakshminarayana, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **66**, 153 (1989).
3. P. E. E. Cook and A. J. Showler, *J. Amer. Chem. Soc.*, **87**, 4594(1965).
4. Von Fisher, W., *Wette Seifen Anstrichm.*, **83**, 507(1981).
5. N. O. V. Sonntag, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **59**, 795A(1982).
6. T. Nismo, T. Chikano, and M. Kamimura, *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1203(1988).
7. W. M. Linfield, R. A. Barauskas, L. Sivieri, S. Serota, and R. W. Stevensan, Sr., *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **61**, 191(1984).
8. M. Buhler and C. Wandrey, *Henkel-Referate*, **24**, 134(1988).
9. Z. Knez and M. Leitgef Proceedings of ISF-Jocs World Congress, Tokyo 281(1988).
10. P. E. Sonnet, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **65**, 900 (1990).
11. A. Wiseman, "Handbook of Enzyme Biotechnology" 2nd Edn, Ellis Horwood Limi ed, Chichxster(1985).
12. P. Meiser and P. L. Luisi, *J. Solid. Phase Biochem.*, **5**, 269(1980).
13. C. Grandi, R. E. Smith, and P. L. Luisi, *J. Biol. Chem.*, **256**, 837(1981).
14. S. Barbaric and P. L. Luisi, *J. Amer. Chem. Soc.*, **103**, 4239(1981).
15. P. D. I. Fletcher, B. H. Robinson, R. B. Freedman, and C. Oldfield, *J. Amer. Chem. Soc.*, **181**, 2667(1985).
16. D. Han and J. S. Rhee, *Biotech. Bioeng.*, XXVIII: 1250(1986).
17. D. Han and J. S. Rhee, *Biotech. Lett.*, **7**, 651 (1985).
18. K. Holmberg and E. Osterberg, *Progress Colloid and Polym. Sci.*, **74**, 150(1987).
19. J. S. Dordick, *Enzyme Microb. Technol.*, **11**, 94 (1989).
20. K. D. Mukderjee, *Biocatalysis*, **3**, 277(1990).
21. K. Holmberg and E. Osterberg, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **65**, 1544(1988).
22. E. Handschumaker and L. Linteris, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **24**, 143(1947).
23. W. D. Pohle and V. C. Mehlenbacher, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **27**, 54(1950).
24. R. E. Smith and P. L. Luisi, *Helv. Chim. Acta.*, **63**, 2302(1980).