

모노글리세리드와 카프릴산으로부터 고정화 리파제를 사용한 디글리세리드 생산

이장운 · 강성태*
서울산업대학교 식품공학과

Synthesis of Diglyceride Containing Caprylic acid by Immobilized Lipase Catalyzed Esterification of Monoglyceride in a Solvent Free System. Lee, Jang Woon and Sung Tae Kang*. *Department of Food Science and Technology, Seoul National University of Technology, Seoul 139-743, Korea* – For the production of diglyceride (DG) containing medium chain fatty acid, which could be utilized as a substrate to structured lipid production, monoglyceride (MG) and caprylic acid were reacted in the presence of lipase. The reaction system was well mixed homogeneously without using any organic solvent. Among the lipases investigated, Lipozyme RM IM and Novozym 435 were selected on the basis of equilibrium DG yields from the medium chain fatty acid and MG. And reaction conditions such as addition of molecular sieve, water content of immobilized lipase, reaction temperature, and mole ratio of MG/caprylic acid are optimized to increase DG production by using Lipozyme RM IM. DG content of reaction mixture showed 8% increase by adding molecular sieve to reaction mixture. Removal of water from the immobilized lipase could affect seriously equilibrium content of DG. More than 2.8% (w/w) removal of water from the support could make 44% of DG. Optimum temperature was found to 60°C. Temperature shift from 60°C to 25°C resulted in increase of free fatty acid (FFA) content. The equilibrium DG yield was not seriously affected by on MG/caprylic acid molar ratio. However, at the stoichiometric ratio of 1:1 the highest DG yield was obtained. Increasing MG/caprylic acid ratio from 0.3 to 1.8 decreased FFA content from 34% to 13%, while MG content increased from 27% to 50%.

Key words: Lipozyme RM IM, diglyceride, caprylic acid, structured lipid, midium chain fatty acid

서 론

글리세롤(GL) 한 분자에 두 개의 지방산이 결합되어 있는 디글리세리드(DG)는 화장품의 계면활성제로도 이용되기도 하며 순수한 위치 특이성을 갖는 1,3-sn-diglycerides와 1(3)-rac-monoglycerides은 인지질과 당지질, lipoprotein 합성의 전구체로 이용된다. DG는 항염증물질과 γ -아미노뷰티릭산(GABA) 등과 같은 여러 약품의 약리 전달물질로 작용하며 효소의 중요한 활성촉진제로서도 이용 가치가 있다 [1, 5, 13]. DG는 특정 식용유에 1%의 phosphatidic acid와 함께 10% 정도 첨가하면 트리글리세리드(TG)만으로 구성되었을 때 보다 약간 친수성을 띄게 함으로써 식품에 기름이 잘 부착 되도록 하는 것으로 알려져 있다[15]. 또한 유지대용물로서의 1,3-DG는 소화능력이 약한 사람과 어린이를 위한 기름으로 개발되었으며, 체내에 섭취되어 혈액을 통해 운반된 후 다시 중성지방 형태로 재합성되어 체지방이나 피하지방으로 축적되는 트리글리세리드와는 달리 간장과 근육으로 운반된 후 지방산과 글리세롤로 분해되어 물과 이산화탄

소로 완전히 연소되어 체내에 축적되지 않는 식용유로서 개발되어 많은 주목을 받고있다[1, 13, 14, 18]. Farzaneh 등[5]은 1,2-DG를 이용한 새로운 입체특이성을 가진 인지질 유도체 합성에 관한 실험을 하여 결과를 발표하기도 하였다.

한편, Matthias 등은 유기용매 중에서 GL과 유리지방산(FFA)으로부터 리파제를 이용하여 DG를 합성하고 DG에 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide(EDCI)와 4-dimethylaminopyridine(DMAP)를 첨가하여 지방산 한분자를 화학적으로 더 부착시킴으로써 재구성지방질을 제조하였다 [18]. 장쇄지방산과 중쇄지방산을 함유한 트리글리세리드인 재구성지방질(Structured lipids)은 오직 중쇄지방산만으로 구성된 중쇄지방질에서 공급하지 못하는 장쇄의 필수지방산을 공급함으로써 영양에 균형을 부여할 수 있는 장점을 지닌 지방질이다[2-7, 9, 12, 16, 17, 23, 24, 26].

현재까지 MG 및 DG와 같은 유지형 계면활성제의 화학공업적인 생산은 주로 모노글리세리드(MG) 생산을 목표로 해왔으며 주로 무기촉매의 존재하에서 220°C 이상의 고온에서 유지와 글리세롤이 에스테르교환반응되는 글리세롤리시스 반응에 의해 생산되어졌다[12, 19]. 그러나 화학공업적인 생산은 과잉의 글리세롤을 사용하여야 하고 수율도 30-40%에 지나지 않으며 고온에서 반응이 진행됨으로 인하여 생산물의 색상이 짙어지게 되며 좋지 않은 냄새가 나게 되는 단

*Corresponding author
Tel: 82-2-970-6736, Fax: 82-2-976-6460
E-mail: kst@snut.ac.kr

점이 있다. 그리하여 근래에는 지방 가수분해 효소인 리파제(lipase)를 이용하는 생물공학적인 생산법에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다[16]. 생물공학적인 공정은 고온 고압이 필요한 화학적 방법에 비해 에너지를 절감할 수 있을 뿐만 아니라 생산공정의 안정성이 높고, 또한 효소의 특이성에 의해 불필요한 부산물을 줄일 수 있다는 이점이 있다[25]. 최근 들어 *Candida rugosa*[1], *Mucor miehei*[4], *Nigella sativa* [20], *Penicillium camembertii*와 *Candida cylindracea*[8] 등의 미생물로부터 얻어진 리파제를 이용한 MG 및 DG 그리고 재구성지방질에 대한 기초 연구는 물론 대량생산을 위한 회분식 반응기의 설계[25]와 같은 공업화에 관련된 연구도 진행되고 있다.

일반적으로 에스테르화반응을 통하여 이들 제품을 생산하기 위한 기질로는 지방산과 글리세롤이 사용되어져 왔다[18, 22]. Mert 등[20]은 해바라기유와 코코아오일에서 얻어진 지방산과 글리세롤을 이용하여 다양한 조성의 글리세리드를 생산해 내었다. Jose 등[12, 13]은 장쇄지방산인 conjugated linoleic acid와 글리세롤을 효소적으로 반응시켜 다양한 조성의 acylglycerol의 생산에 대하여 연구하였으며 지방산과 글리세롤의 몰비율을 달리하여 에스테르 결합으로 인한 DG의 생산을 시도하였다. 그러나 이러한 에스테르화 반응은 유기용매에서 반응이 진행되므로 기질이 희석되어 고농도에서의 반응이 불가능하고 기질들이 서로 불균일하여 혼화에 강력한 교반이 필요하며 연속반응이 불가능한 단점을 갖고 있다.

최근에는 유지(트리글리세리드)와 글리세롤을 사용한 글리세롤리시스 반응을 시킴으로써 DG를 생산하는 기술이 개발되었다. McNeill 등[19]은 반응온도조절에 의한 고상계에서의 글리세롤리시스 반응을 수행함으로써 유지로부터 약 70%의 MG를 얻었으며, 강 등[15, 27]은 경화유지를 사용하여 고상계에서 온도조절을 통하여 글리세리드 반응(Solid-Phase Glycerolysis)을 수행하여 73%의 1,3-DG와 27%의 1,2-DG로 구성된 다량의 DG를 생산해 내었다. 한편 유지와 글리세롤을 원료로 하는 글리세롤리시스 반응은 원료가 더욱 서로 혼화되지 않고 층 분리가 일어나 반응속도가 낮고 연속공정에 어려움이 있는 것이 단점으로 지적되어 왔다. 더욱이 지금까지 진행된 DG 생산을 위한 효소적인 합성연구는 주로 장쇄지방산을 이용하여 왔으며 중쇄지방산을 함유한 DG를 생산하기 위한 시도는 아직까지 보고되어 있지 않다. 본 연구자들은 유기용매를 사용하지 않고 MG와 중쇄지방산을 기질로 사용함으로써 액상분리가 일어나지 않는 균일한 반응계를 구성하여 DG를 효과적으로 생산하였기에 그 결과를 보고한다.

재료 및 방법

재료

실험에 사용된 리파제는 lipase CES(3,100 U/g), lipase

AK(20,000 U/g, Amano, Japan), lipase OF(400,000 U/g), lipase MY(60,000 u/g, Meito sangyo, Japan), Lipolase 100T(100 LU/g), Lipopan 50 BG(50 KLU/g, Novo Nordisk, USA), Novozym 435(10,000 PLU/g, Novo Nordisk, USA), Lipozyme RM IM(5 BAUN/g, Novo Nordisk, USA)를 사용하였다. Lipozyme RM IM은 특별한 언급이 없는 한 Lipozyme RM IM을 48시간 이상 vacuum dry oven에서 건조시켜 사용하였고 Lipozyme RM IM의 담체 중의 수분 함량을 조절하기 위해서는 일정 시간별로 채취하여 0.0-3.3%의 수분함량을 제거한 후 DG 합성 반응에 사용하였다. MG는 (주)일신웰스로부터 순도 95% 이상의 제품(GF-900, Ilshin Wells, Korea)을 공급받아 기질로 사용하였고 그 FFA 조성은 stearic acid 2%, palmitic acid 23%, oleic acid 20%, linoleic acid 50%이었다. DG 합성을 위한 중쇄지방산으로는 caprylic acid, capric acid, caproic acid(Junsei Chemical, Japan)를 사용하였다. 반응 중에 생성되는 수분의 제거를 위해 pore size 4Å의 molecular sieve(Sigma-Aldrich, USA)를 반응혼합액 대비 17%(w/w)로 첨가하였다.

DG 합성을 위한 반응혼합물의 제조

DG의 합성을 위해 MG와 caprylic acid를 1:1(mole/mole) 비율로 혼합하고 혼합물 1 g당 0.036 BAUN/g의 효소를 첨가하여 60°C를 유지하는 water bath상의 반응용기 내에서 수행하였다. 반응혼합물은 자석교반기를 사용하여 500 rpm으로 고정하여 교반하였다. 특별한 언급이 없는 한 위의 조건으로 일정한 시간마다 반응액을 채취하여 그 조성을 TLC/FID를 사용하여 분석하였다.

DG 합성 반응액의 분석

반응혼합물(150 mg)을 일정 시간마다 채취하여 클로로포름(Showa Chemical, Japan)으로 추출한 후 TLC/FID(Iatroscan MK-50, Iatron Laboratories, Tokyo, Japan) 분석에 이용하였다. 반응혼합물은 TG 생산 없이 FFA, 1,3-DG, 1,2-DG, MG의 peak로 분리되었다[15]. 실리카로 코팅된 rod (Chromarod S III quartz rods, Iatron Laboratories, Tokyo, Japan)에 1 µL의 클로로포름 추출물을 spotting하고 hexane/diethylether/acetic acid(55:15:0.5, v/v/v)의 전개 용매에 전개시킨 다음 이것을 102°C에서 10분간 건조시킨 후 TLC/FID로 분석하였다. 반응혼합물의 조성은 peak areas의 백분율(%)로 표시하였다[11, 24].

결과 및 고찰

DG 합성을 위한 효소 선정 및 지방산 선정

8종의 리파제를 각각 0.1 g씩 첨가하여 37°C에서 24시간 동안 반응시켜 DG 생산성이 높은 효소를 선발하였다. 조사된 리파제 중에 Lipozyme RM IM과 Novozym 435만이

Table 1. Diglyceride content of 24 hr-reaction mixture according to the reaction of various free fatty acids and monoglyceride.

Lipase	Free fatty acid	FFA (%)	MG (%)	TDG (%)
Lipozyme RM IM	caproic acid (C ₆)	9.5	64.7	25.7
	caprylic acid (C ₈)	7.0	58.2	34.8
	capric acid (C ₁₀)	13.7	54.5	31.8
Novozym 435	caproic acid (C ₆)	14.6	53.3	32.1
	caprylic acid (C ₈)	15.5	53.9	30.5
	capric acid (C ₁₀)	12.1	50.7	37.2

Reaction condition: 60°C, MG/caprylic acid = 1:1(mole/mole), water content of Lipozyme RM IM: 1.0%, non addition of molecular sieve.

DG를 효과적으로 생산하였다.

Lipozyme RM IM과 Novozym 435가 각종 중쇄 지방산의 DG합성에 미치는 영향을 보았다(Table 1). 카프로산과 카프릴산에서는 Lipozyme RM IM보다 Novozym 435이 각각 6.4%, 5.4%의 DG가 더 합성되었지만 카프릴산에서는 Lipozyme RM IM이 4.3%의 DG가 더 생산되었다. 이들 결과로부터 중쇄지방산인 카프릴산과 Lipozyme RM IM을 본 실험의 DG 합성에 이용하였다.

고정화효소의 수분함량과 molecular sieve 첨가가 DG 생산에 미치는 영향

다양한 수분함량의 고정화 효소를 사용하고 molecular sieve를 첨가하여 합성반응으로 생성되는 수분을 제거함으로써 DG 전환율을 높이고자 시도하였다. 건조전의 고정화 효소의 초기수분함량은 고정화 효소에 대하여 3.8%(w/w)였고 진공 건조를 통하여 0.3%(w/w)에서 3.3%(w/w)까지 제거할 수 있었다. 조사된 고정화 효소의 모든 수분함량 범위에서 molecular sieve를 첨가함으로써 첨가하지 않은 경우 보다 반응 24시간 후의 DG 생산은 평균 8%이상 증가되었다(Fig. 1). 또한, 고정화 효소의 수분이 많이 제거될수록 DG의 생산이 증가하였으며 고정화 효소의 담체 중 수분 제거율이 2.8% 이상인 경우 약 44%의 DG가 생산되었다.

반응온도가 DG 생산에 미치는 영향

반응온도를 40°C-80°C로 달리하였을때 24시간 후의 DG 생산을 평가하였다(Fig. 2). 반응온도 60°C에서 44%의 DG가 생성됨으로써 가장 적합한 온도로 확인되었으며 40°C와 50°C에서는 DG 함량이 각각 36%, 39%로 낮게 나타났다. 반응온도가 70°C와 80°C에서는 각각 41%, 43%의 DG 함량을 나타내었다. 반응최적온도인 60°C에서의 24시간 후의 DG, FFA, MG가 각각 44%, 24%, 32%로 나타났다.

Fig. 3은 반응온도를 초기 6시간 동안 60°C로 유지하고 다시 상온(25°C)으로 유지하여 온도변화가 반응에 미치는 영향을 살펴 본 결과이다. 반응온도를 낮춤으로써 Kang[15] 등

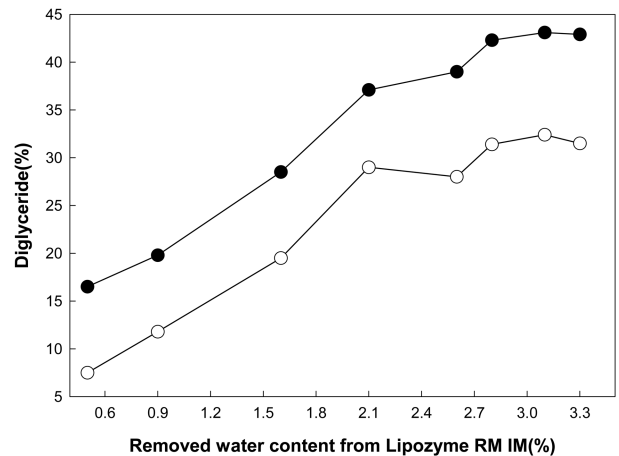


Fig. 1. The effect of water content of Lipozyme RM IM and the effect of addition of molecular sieve on the diglyceride production after 24 hr-reaction. Addition of molecular sieve (●), non addition of molecular sieve (○). Reaction condition: 60°C, MG/caprylic acid = 1:1 (mole/mole), water content of Lipozyme RM IM: 0.5%, 0.7%, 1.0%, 1.2%, 1.7%, 2.2%, 2.9%, 3.3%.

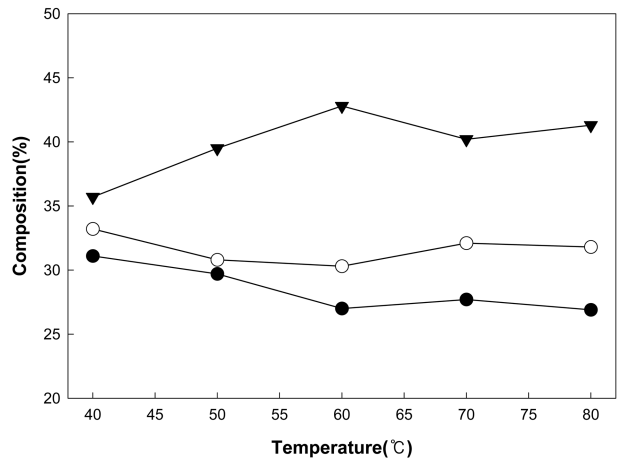


Fig. 2. The effect of reaction temperature on the composition of reaction mixture at 24 hr. MG (○), FFA (●), TDG (▼). Reaction condition: 40°C, 50, 60°C, 70°C, 80°C, MG/caprylic acid = 1:1 (mole/mole), water content of Lipozyme RM IM: 1.0%.

의 경화우지를 사용한 고상계반응처럼 DG의 생산쪽으로 반응이 진행되지는 아니하였으며 반응 초기 6시간 만에 반응 혼합물의 DG 함량은 34%를 나타내었고 반응 36시간 후에는 36%로 DG 함량의 큰 변화를 보이지 않았다. 오히려 FFA의 함량이 16%에서 28%로 많이 생성되었다. 한편 25°C에서의 반응 60시간 이후에는 DG 함량은 감소하였고 상대적으로 FFA의 함량이 높아지는 경향을 보여주었다. 한편, 반응시간 84시간만에 DG 함량은 27%로 감소하였고 FFA 함량은 31%로 증가하였다. 이 결과로부터 상온에서의 DG 합성반응은 합성반응에 의해 생성된 수분을 충분히 제거하지 못하여 리파제에 의한 가수분해반응을 증가시키는 것으로 판단되며 따라서 고온에서 저온으로의 전환은 DG 합성에

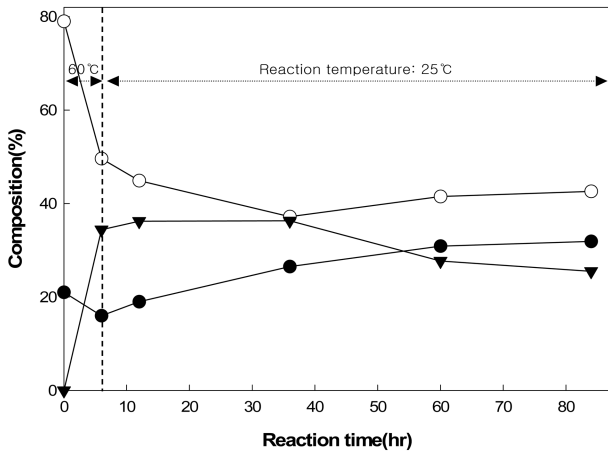


Fig. 3. The effect of temperature programming on diglyceride production from MG and caprylic acid during enzymatic synthesis. After incubation of reaction mixture for 6 hr at 60°C, the mixture was transferred to 25°C. MG (○), FFA (●), TDG (▼). reaction condition: MG/caprylic acid = 1:1(mole/mole), water content of Lipozyme RM IM: 1.0%.

적합하지 않은 것으로 판단되었다. 온도에 따른 DG 생산 수율과 온도 전환의 결과로부터 반응최적온도는 60°C로 판단되었다.

MG와 카프릴산의 몰비율이 DG 합성에 미치는 영향

MG와 카프릴산의 혼합비율을 달리하여 molar ratio의 변화에 의한 DG 합성에 미치는 영향을 살펴보았다(Fig. 4). 조사된 모든 몰비율에서 반응 24시간 후의 DG의 생산량은 40% 전후로 큰 차이를 나타내지 않았다. 그러나 화학양론적인 몰비율인 1:1(MG/caprylic acid)에서 가장 많은 DG가 생산되었다(41% DG, 17% FFA, 42% MG). MG/caprylic acid가 1.4:1 이상인 경우 MG의 함량은 47% 이상으로 1:1

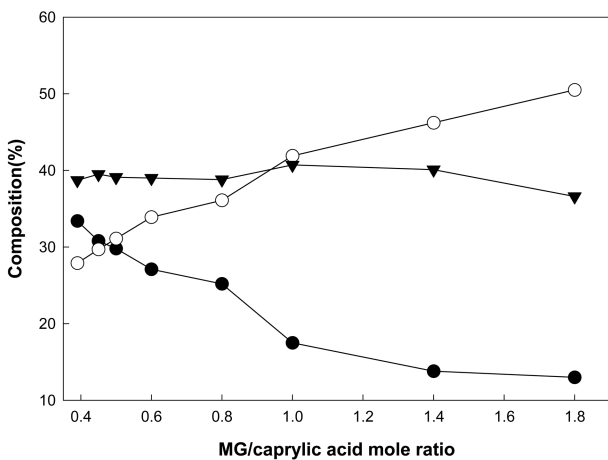


Fig. 4. The effect of mole ratio of caprylic acid and monoglyceride on DG synthesis after 24hr reaction. MG (○), FFA (●), TDG (▼). reaction condition: 60°C, MG/caprylic acid = 1:1 (mole/mole), water content of Lipozyme RM IM: 1.0%.

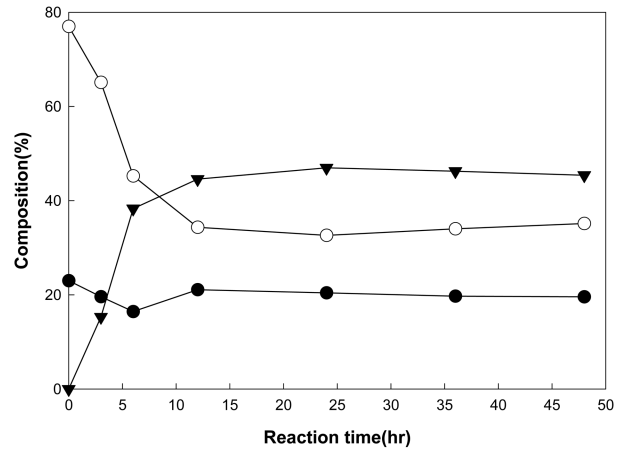


Fig. 5. The change of composition of the reaction mixture during the enzymatic synthesis of diglyceride by Lipozyme RM IM. MG (○), FFA (●), TDG (▼). reaction condition: 60°C, MG/caprylic acid = 1:1 (mole/mole), water content of Lipozyme RM IM: 1.0%.

의 경우에 비하여 증가하였고 FFA 함량은 15% 이하로 감소하였다. 한편 MG/caprylic acid가 0.5:1 이하인 경우 반응 혼합물의 FFA의 함량은 점점 증가하여 30% 이상의 함량을 나타내었다. 전반적으로 MG와 카프릴산의 몰비율이 높아질수록 반응물 중의 MG 함량이 높아졌고 FFA 함량은 낮아졌다.

최적조건에서의 MG와 카프릴산 합성반응에 의한 DG 생산

최적화 된 조건에서 MG와 카프릴산 합성반응으로 DG로 전환되는 과정을 Fig. 5에 나타내었다. 반응 초기인 3시간 만에 DG 16%가 생산되었고 FFA과 MG가 각각 20%와 64%가 존재하였다. 반응 12시간에는 DG가 44% 생산되었으며 FFA과 MG가 각각 21%와 35%가 존재하였다. 12시간 이후 DG 함량은 평형에 도달하여 변화는 거의 일어나지 않았다. 결론적으로 MG와 카프릴산을 1:1(mole/mole)로 제조하고 반응혼합물 g당 Lipozyme RM IM과 molecular sieve를 각각 0.071 BAUN/g과 17%(w/w)로 첨가하여 60°C에서 반응시킨 최적조건에서 12시간만에 44%의 DG를 생산할 수 있었다.

중쇄지방질을 함유한 DG는 향후 재구성지방질의 생산을 위한 반응기질로서의 이용이 기대된다. 또한 글리세롤리시스 반응에 의한 DG 생산 반응과 달리 균일상에서의 반응이 가능하고 유기용매를 사용하지 않고 고농도 DG의 생산이 가능하므로 향후 충전탑 반응기(packed bed reactor)에서의 연속 반응에 대한 연구가 기대된다.

요 약

재구성 지방질의 기질로서 사용될 수 있는 중쇄지방산을 함유한 디글리세리드(DG)를 생산하기 위하여 리파제를 사

용하여 중쇄지방산과 모노글리세리드(MG)로부터 DG를 생산하는 유기용매를 사용하지 않는 반응 시스템을 고안하였다. 조사된 리파제 중에 Lipozyme RM IM과 Novozym 435만이 중쇄지방산(caprylic acid, caproic acid, capric acid)과 MG로부터 DG를 효과적으로 생산하였다. 고정화 효소인 Lipozyme RM IM을 사용하여 중쇄지방산인 카프릴산과 MG를 반응시킴으로써 DG 생산을 위하여 molecular sieve 첨가에 의한 반응혼합액 중의 수분 제거, 고정화 효소의 수분함량, 반응온도, MG/카프릴산의 몰비율 등의 생산 조건을 최적화하였다. Molecular sieve를 첨가 하였을 때 약 8%의 DG 함량이 증가되었으며 고정화효소(초기 수분함량: 3.8%(w/w)의 수분을 2.8%(w/w) 이상 감소시킴으로써 44%의 DG를 생산할 수 있었다. 최적의 반응 온도는 60°C로 확인되었으며 60°C에서 25°C로의 온도 변화는 FFA의 함량이 증가하여 DG 생산에 적합하지 아니하였다. 조사된 모든 몰비율에서 반응 24시간 후의 DG의 생산량은 40% 전후로 큰 차이를 나타내지 않았으나 화학양론적인 몰비율 1:1(MG/caprylic acid)에서 가장 많은 DG가 생산되었다. 또한 MG와 카프릴산의 몰비율이 0.3에서 1.8로 높아질수록 반응물 중의 FFA의 함량이 34%에서 13%로 감소하였고 MG 함량은 37%에서 50%로 증가하였다.

REFERENCES

1. Anna, M. F., L. Tian, P. Adlercreutz, and B. Mattiasson. 1997. Preparation of diglycerides by lipase-catalyzed alcoholysis of triglycerides. *Enzyme Microb. Technol.* **20**: 198-206.
2. Akoh, C. C. 1998. Structured lipids, p. 877-908. In Acho, C. C. and D. B. Min (eds.), *Food Lipids: Chemistry, Nutrition and Biotechnology*, Marcer Dekker, Inc., New York.
3. Bradley, B. G. 1998. Structured lipids: evidence evolving for widespread use. p. 117-121. In Christophe, A. B. (ed.), *Structural Modified Food Fats: Synthesis, Biochemistry and Use*, AOCS press, Champaign.
4. Christensen, M. S., J. C. E. Hoy, C. C. Beaker, and T. G. Redgrave. 1995. Intestinal absorption and lymphatic transport of eicosapentaenoic (EPA), Docosahexenoic (DHA), and Decanoic acids: dependence on intramolecular triacylglycerol structure. *Am. J. Clin. Nutr.* **61**: 56-61.
5. Farzaneh, S., D. W. Roodsari, S. P. Gregory, and J. Hajdu. 1999. A New approach to the stereospecific synthesis of phospholipid the use of L-glyceric acid for the preparation of diacylglycerol. *J. Org. Chem.* **64**: 7727-7737.
6. Fomuso, L. B. and C. C. Akoh. 1998. Structured lipids: lipase-catalyzed interesterification of tricaproin and trilinolein. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **75**: 405-410.
7. Gunstone, F. D. 1998. Movements towards tailor-made fats. *Prog. Lipid Res.* **37**: 227-305.
8. Haraldsson, G. G. 1992. The Chemistry of the Functional Groups, Supplement B2: The Chemistry of Acid Derivatives, p. 1395-1473, In Patai, S. (ed.), *The Application Of Lipases in Organic Synthesis*, in pp. 1359-1473 *Biotech. Bioeng.*
9. Haraldsson, G. G., A. Halldorsson, and E. Kulas. 2000. Chemoenzymatic synthesis of structured triacylglycerols containing eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **77**: 1157-1165.
10. Husmann, B. F. 1997. Nutritional aspects of n-3 fatty acids. *INFORM.* **8**: 428-447.
11. Jennings, B. and C. C. Akoh. 1999. Enzymatic modification of triacylglycerols of high eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids content to produce structured lipids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **76**: 1133-1137.
12. Jose, A., C. O. Arcos, and C. G. Hill. 1998. Rapid enzymatic production of acylglycerols from conjugated linoleic acid and glycerol in a solvent-free system. *Biotechnol. Lett.* **20**: 617-621.
13. Jose, A., C. O. Arcos, and C. G. Hill. 1998. Continuous enzymatic esterification of glycerol with (poly)unsaturated fatty acids in a packed-bed reactor, *Biotechnol. Bioeng.* **68**: 563-570.
14. Jumpsen, J. and M. T. Clandinin. 1995. Brain development: Relationship to dietary lipid and lipid metabolism, pp. 199. AOCS Press, Champaign.
15. Kang, S. T. and T. Yamane. 1994. Effect of temperature on diacylglycerol production by enzymatic solid-phase glycerolysis of hydrogenated beet tallow. *K. J. Food Sci. Tech.* **26**: 567-572.
16. Kwon, S. J., J. J. Han, and J. S. Rhee. 1995. Production and in situ separation of mono- or diacylglycerol catalyzed by lipases in n-hexane. *Enzyme Microb. Technol.* **17**: 700-704.
17. Lee, K. T. and C. C. Akoh. 1998. Immobilized lipase-catalyzed production of structured lipids with eicosapentaenoic acid at specific positions. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **73**: 611-615.
18. Matthias, B., Kurt, L., and M. P. Schneider. 1992. Enzymatic esterification of glycerol I. lipase-catalyzed synthesis of regioisomerically pure 1,3-sn-diacylglycerols. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **69**: 955-960.
19. McNeill, G. P. and T. Yamane. 1991. Further improvements in the yield of monoglycerides during enzymatic glycerolysis of fats and oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **68**: 6-10.
20. Mert, S., A. Ogawa, and H. Konishi. 1999. A rapid method for enzymatic synthesis and purification of the structured triacylglycerol, 1,3-dilauroyl-2-oleoyl-glycerol. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **76**: 927-931.
21. Nettleton, J. A. 1995. Omega-3-fatty acids and health, pp. 359-362. Chapman and Hall. New York.
22. Rosu, R., M. Yasui, Y. Iwasaki, and T. Yamane. 1999. Enzymatic synthesis of symmetrical 1,3-diacylglycerols by direct esterification of glycerol in solvent-free system. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **76**: 839-843.
23. Schmid, U., U. T. Bornscheuer, M. M. Soumanou, G. P. McNeill, and R. D. Schmid. 1998. Optimization of the reaction conditions in the lipase-catalyzed synthesis of

- structured triglycerides. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **75**: 1527-1531.
24. Shimada, Y., A. Sugihara, K. Maruyama, T. Nagao, S. Nakayama, H. Nakano, and Y. Tominaga. 1996. Production of structured lipid containing docosahexaenoic and caprylic acids using immobilized *rhizopus delemar* lipase. *J. Ferment. Bioeng.* **81**: 299-303.
25. Subramani, S. and C. C. Akoh. 2001. Synthesis of structured lipids by transesterification of trilinolein catalyzed by lipozyme IM60. *J. Agric. Food Chem.* **49**: 2071-2076.
26. Yang, T. H. 1999. Enzymatic synthesis of low-calorie structured lipids in a solvent-free system. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **78**: 291-296.
27. Yamane, T., S. T. Kang, K. Koizumi, and Y. Kawahara. 1994. High-yield diacylglycerol formation by solid-phase enzymatic glycerolysis of hydrogenated beef tallow. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **71**: 339-342.

(Received Aug. 25, 2009/Accepted Sep. 19, 2009)