J Korean Soc Food Sci Nutr
38(3), 338~345(2009)

한국식품영양과학회지
DOI: 10.3746/jkfn.2009.38.3.338

회분식반응기를 이용한 미강유, 팜스테아린과 고올레인산 해바라기씨유 유래 대량 제조된 저트랜스 쇼트닝의 특성 연구

김지영 · 이기택†
충남대학교 식품공학과

Characterization of Scaled-up Low-Trans Shortening from Rice Bran Oil and High Oleic Sunflower Seed Oil with Batch Type Reactor

Ji-Young Kim and Ki-Teak Lee†

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

Abstract

Scaled-up low-trans shortening (LTS) was produced by lipase-catalyzed interesterification. Blend of rice bran oil (RBO), palm stearin (PS) and high oleic sunflower seed oil (HO) with 1:2:0.9 (w/w/w) ratio was interesterified using immobilized lipase from *Thermomyces lanuginosus* (TLIM) in the batch type reactor at 65°C for 24 hr, and physicochemical melting properties of LTS were compared with commercial shortening. Solid fat content (SFC) of commercial shortening (used as control) and LTS was similar at 9.56 and 8.77%, respectively, at 35°C. Major fatty acids in LTS were C16:1 (33.7 wt%), C18:1 (45.7 wt%) and C18:2 (13.4 wt%). Trans fatty acid content in the commercial shortening (4.8 wt%) was higher than that of LTS (0.5 wt%). After reverse-phase HPLC analysis, major triacylglycerol (TAG) species in LTS were POO, POP and PLO. Total tocopherol, γ-oryzanol and phytosterol contents in the LTS were 12.37, 0.43 and 251.38 mg/100 g, respectively. Hardness of LTS was similar to that of commercial shortening. Also, x-ray diffraction analysis showed coexistence of β′ and β form in the LTS.

Key words: interesterification, low-trans shortening, commercial shortening, physicochemical properties, x-ray diffraction

서 론

트랜스지방산은 cis형의 불포화지방산을 가진 식물성 유지가 촉매의 존재 하에 수소가 첨가되어 반고체 상태로 부분 경화될 때 생성된다. 쇼트닝과 같은 반고체지는 높은 식미감을 부여하고 유지의 저장 및 유통기간을 연장시킨다는 이점이 있어 사용되어 왔다(1). 그러나 근래의 연구 결과에 따르면 트랜스지방산의 섭취는 건강상 안 좋다고 알려진 저밀도 지단백(low density lipoprotein, LDL) 콜레스테롤 수치를 증가시키는 반면 건강상 좋다고 알려진 고밀도 지단백(high density lipoprotein, HDL) 콜레스테롤의 수치는 감소시키며(2), 심혈관계 질병의 발생률을 높이고, 동맥경화, 당뇨, Alzheimer 등의 질환을 악화시키는 결과를 초래할 수도 있다고 보고되고 있다(3). 이에 외국에서는 트랜스지방산의 함량 및 섭취수준에 대한 조사 및 연구가 이미 행해지고 있으며 이러한 연구 결과를 토대로 국제적으로 트랜스지방산의 섭취를 제한하려는 법령이 발표되었다. 미국과 캐나다에서는 각각 2005년 12월과 2006년 1월부터 영양표시항목에 트랜스지방산 함량을 의무적으로 표기하도록 하였고, WHO(세계보건기구)에서는 하루 섭취 열량 중 트랜스지방 섭취에 따른 열량이 1%를 초과하지 않도록 권고하고 있다(4). 이에 따라 우리나라도 소비자의 알 권리 보호 및 국민보건향상을 위하여 식품의약품안전청(KFDA, Korea)에서는 2008년 12월부터 빵, 캔디, 초콜릿 등의 과자류나 면류, 레토르트 식품, 음료류 등의 식품에서 비만이나 당뇨, 심혈관계 질환 등의 원인이 된다고 알려진 당류, 콜레스테롤뿐만 아니라 트랜스지방 등의 함량은 반드시 표기하도록 의무화하였다(5).

재구성지질(structured lipids, SL)은 화학적 또는 효소적 방법에 의해 triacylglyceride(TAG) 분자 안에서 지방산의 조성, 위치를 무작위 또는 선택적으로 변화시키거나 새로운 기능성 지방산의 결합에 의해 생성될 수 있다(6). 화학적 합성반응의 경우 에너지 소비가 크고, 부반응이 생기는 반면 효소적 합성반응은 효소의 기질 및 반응 특이성을 이용하여 반응을 선택적이고 효율적으로 할 수 있다는 장점이 있다. 또한 효소적 합성은 효소를 사용하여 기질 자체의 지

†Corresponding author. E-mail: ktlee@cnu.ac.kr
Phone: 82-42-821-6729, Fax: 82-42-822-6729

방산을 무작위 또는 선택적으로 재배열시키는 것으로 이성체의 큰 변화 없이 유지의 물리적 또는 화학적 특성을 변화시킬 수 있다(7). 한편 위치 특이성을 가진 lipase를 통한 효소적 합성은 원하는 지방산 조성의 재구성 지질을 생성할 수도 있다. 또한 고정화 효소(immobilized lipase)는 재사용이 가능하여 환경 친화적이고 고부가 가치의 다양한 유용물질을 선택적, 효율적으로 생산해낼 수 있다는 장점이 있다. Karabulut 등(8)은 화학촉매를, Zhang 등(9)은 효소촉매를 이용하여 esterfication 방법을 통한 고체지를 합성한 바 있으며, Farmani 등(10)은 화학적 반응과 효소적 esterfication반응을 이용하여 저트랜스 고체지를 합성한 후 그 특성을 비교하였다.

본 연구에서 사용된 미강유는 벼의 도정 중에 생산되는 부산물로부터 얻어지는데, 미강유는 적극적인 국내 생산 유지 자원개발이라는 점에서 중요한 의의를 가진다. 또한 미강유에는 항산화 물질로 잘 알려진 토코페롤과 오리자놀은 천연 항산화제로서 큰 관심을 모으고 있다(11). 이에 본 연구에서는 미강유(RBO), 팜스테아린(PS), 고올레인산 해바라기씨유(HO)를 기질로 사용하여 회분식 반응기(batch type reactor)에서 sn-1, 3의 위치에 주로 특이적으로 작용하는 TLIM(12)을 이용한 interesterification을 통해 대량 생성된 저 트랜스 쇼트닝의 이화학적 특성과 결정학적 성질을 살펴보았다.

재료 및 방법

재료

사용된 미강유(rice bran oil, RBO)는 주식회사 세림(Serim Co., Daejeon, Korea)에서, 팜스테아린(palm stearin, PS)과 고올레인산 해바라기씨유(high oleic sunflower seed oil, HO)는 C사(Incheon, Korea)에서 제공받아 사용하였으며, 시중 유통 쇼트닝은 국내 Q사(Incheon, Korea)의 쇼트닝을 구입하여 비교 군으로 사용하였다. 재구성 지질의 합성을 위하여 사용된 lipase인 *Thermomyces lanuginosus* immobilized lipase(TLIM)는 *Thermomyces lanuginose*로부터 획득된 lipase가 silica gel에 고정화되어 granulated화 된 효소이고(13), 이는 Novo Nordisk Biochem North American Inc.(Flanklinton, NC, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 유지의 sn-2 position의 지방산 조성을 분석하기 위한 pancreatic lipase(Type Ⅱ, crude)는 Sigma-Aldrich Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. 기기분석 시 사용된 용매는 HPLC grade를 사용하였다. α-tocopherol 및 β, γ-tocopherol 표준시약은 각각 Fluka Chemika-Biochemika(Buchs, Switzerland)와 Sigma-Aldrich Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, 오리자놀 및 phytosterol 분석을 위한 표준시약은 각각 Wako Pure Chemical Ind., Ltd.(Osaka, Japan)와 Fluka Chemika-Biochemika(Buchs, Switzerland)에서 구입하여 사용하였다.

회분식 반응기를 이용한 저트랜스 쇼트닝의 효소적 합성

미강유(RBO), 팜스테아린(PS) 및 고올레인산 해바라기씨유(HO)를 1:2:0.9(150:300:135 g, w/w/w) 비율로 이중자켓으로 제작된 1 L 회분식 반응기에서 65°C로 일정하게 유지하여 24 hr 반응하였다. TLIM은 전체 반응 기질의 10 wt%에 해당하는 양을 사용하였다. Impeller를 stirrer motor(TOPS, MS-3060D, Korea)에 장착하여 270 rpm으로 유지함으로써 기질과 효소를 충분히 교반하였으며, 반응 후 기질은 PTFE syringe로 효소를 여과하여 보관하였다. 이후 탈산 과정을 통하여 합성 중 발생한 유리지방산을 제거하여 실험에 사용될 저트랜스 쇼트닝(low-trans shortening, LTS)을 획득하였다. 탈산은 합성된 쇼트닝에 1 N 페놀프탈레인 용액을 지시약으로 몇 방울 첨가한 후 2 N과 0.5 N KOH 에탄올 용액을 사용하여 분획 깔때기에서 적정하였다. 적정이 끝난 후 물(70~80°C)을 이용하여 비누화된 물질을 제거해주는 일을 수차례 반복하였다. 이에 헥산과 에탄올을 첨가하여 시료가 수분 층과 완전히 분리될 수 있도록 충분히 정치시킨 후 상층 액인 헥산층만 분리하여 sodium sulfate를 이용하여 수분과 불순물을 제거하였다. 이를 질소가스를 사용하여 헥산을 완전히 제거한 후 다음 분석을 위해 냉장 보관하였다.

지방산 조성 분석

저 트랜스 쇼트닝(LTS) 및 시중 유통 쇼트닝의 지방산 조성 분석을 위하여 gas chromatography(GC)분석을 실시하였다. 탈산 전의 시료를 thin layer chromatography(TLC, 20×20 cm, Merck, Germany)를 통해 triacylglycerol(TAG) 부분만 획득하여 methylation을 실시하였다. 시료(약 25 mg)를 취하여 1.5 mL의 0.5 N NaOH 메탄올 용액을 가한 후 100°C에서 5분간 반응시키고 30~40°C에서 냉각해주었다. 이에 2 mL의 BF3-methanol 용액을 가하여 다시 100°C에서 2분간 반응시키고 30~40°C에서 냉각해준 후, 2 mL의 iso-octane과 1 mL의 포화 NaCl 용액을 가하여 약 1분 동안 교반해주었다. 두 층이 분리되도록 충분히 방치 후, 위층을 취하여 sodium sulfate column을 통과시켜주었다. 지방산 조성 분석 시 gas chromatography(Hewlett-Packard 6890 series, PA, USA)를 이용하였고, detector는 flame ionized detector(FID)를 사용하였으며, carrier gas는 질소로써 52.5 mL/min, 260°C로 설정하여 실행하였다. Column은 SP™-2560(100 m×0.25 mm I.d., 0.2 μm film thickness, Bellefonte, PA, USA)을 사용하였고, column oven 온도는 150°C에서 5분 동안 유지 후 4°C/min씩 증가시켜 220°C에 도달하여 30분간 유지하였다. Inject port와 detector 온도는 각각 250과 260°C로 설정하였고, split ratio는 50:1로써 시료 1 μL를 주입하여 지방산 분석을 실행하였다. 한편, GC-FID상에서의 분석은 각 지방산의 메틸에스테르 형태로 이루어지므로 이

를 다시 해당 지방산으로 전환해야 하는데, 각 지방산 별 전환계수는 식약청에서 제시한 표와 계산식(14)을 이용하였다. 트랜스형의 지방산의 경우, 시스형의 경우와 동일한 전환계수를 사용하여 계산하였다.

Pancreatic lipase analysis에 의한 위치별 지방산 조성

대량 합성된 저트랜스 쇼트닝(LTS)의 sn-2 및 sn-1,3 위치의 지방산 조성 분석을 위해 pancreatic lipase에 의한 가수분해를 실행하였다. 약 7 mg의 시료에 7 mL의 1 M Tris-HCl buffer(pH 7.6), 1.75 mL의 0.05% bile salt, 0.7 mL의 2.2% $CaCl_2$ 및 7 mg pancreatic lipase를 넣어준 후 충분히 교반해주었다. 항온수조(37°C)에서 3분 반응, 교반 1분을 3~4회 반복하였다. 반응 후 4 mL diethyl ether를 첨가하여 교반하고 상층액만 취하여 sodium sulfate column을 이용하여 불필요한 수분과 불순물을 제거해 주었다. 전개용매는 hexane : diethyl ether : acetic acid=50:50:1(v/v/v)을 사용하여 TLC분석을 실시하였고, 2-monoacylglycerol(MAG) band를 분리하여 GC 분석을 하였으며, 분석조건은 지방산 조성 분석과 동일한 방법으로 수행하였다. 한편 sn-1,3 조성 계산은 Fomuso와 Akoh의 계산식(15)을 사용하였으며, 계산식은 아래와 같다.

Sn-1,3(%)=(3TAG−sn-2)/ 2

DSC 분석

Differential scanning calorimetry(DSC)는 시료의 물리적인 상태가 변했을 때 화학반응으로 생기는 열의 흡수나 방출을 측정하여 시료의 solid fat content(SFC)를 측정하는 것이다. DSC(model DSC 2010, TA Instruments, New Castle, USA)를 이용하여 유지의 solid fat content(SFC)를 측정하였다. 분석 시 calibration을 위한 base line은 빈 cell을 통한 분석결과를 이용하였고, 각각의 시료는 약 7 mg을 취하여 분석하였다. Thermogram을 얻기 위해 80°C에서 10분 동안 유지한 후 10°C/min의 비율로 -60°C까지 냉각하여 그 상태에서 10분 동안 유지시켜주고 다시 80°C까지 5°C/min의 비율로 승온하도록 설정하여 분석을 실시하였다.

Slip melting point 측정

유지의 slip melting point를 측정하기 위하여 시료를 완전히 용해시키고, capillary tube(Chase Scientific Glass Inc., 75 mm×1.2 mm i.d., USA)의 약 1 cm정도 양만큼 채취하여 -8°C에서 10분 동안 보관한 후 사용하였다. 증류수가 담긴 비커에서 stirrer로 교반하여 전체적으로 열전도가 균일하게 이루어지도록 하였으며 cupric sulfate($CuSO_4$) 용액이 든 칼럼을 이용하였다. 시료가 담긴 capillary tube는 온도계 하단에 부착하여 칼럼에 넣은 후, 중탕하여 분석을 실행하였다. 온도가 상승함에 따라 시료가 capillary tube를 타고 상승하기 시작할 때의 온도를 slip melting point로 지정하였고, 분석은 3차례 반복 실행하였다.

Reversed-phase high performance liquid chromatography(RP-HPLC)를 이용한 재구성 지질 분석

저트랜스 쇼트닝(LTS)의 triacylglycerol(TAG) 조성과 반응에 사용된 기질 내 TAG 조성과의 비교를 위하여 RP-HPLC 분석을 시행하였다. 시료 약 15 mg을 취하여 20 mL의 클로로포름에 희석한 후, PTFE syringe filter를 이용하여 여과 후, 그 중 20 μL를 주입하였다. Detector는 ZAM 3000 evaporative light scattering detector(ELSD, Young-Lin, Korea)를 사용하였고 55°C와 1.7 bar로 설정하였다. Column은 Nova-Pak® C18 60Å 4 μm(3.9×150 mm I.d., Waters, Milford, Ireland) 이용하여 분석을 실시하였다. 이동상은 기울기 용리로써 (A)acetonitrile/(B)hexane : isopropanol(2:1)을 사용하였고, 용리조건은 0~45 min, 20% B; 45~60 min, 46% B; 60~65 min, 20% B이다. 분석 시 유속은 1 mL/min으로 흘려주었다. Partition number(PN)는 아래의 계산식에 준하여 구했으며, CN은 TAG의 전체 탄소수를 나타내며, ND는 총 이중결합 수를 나타낸다(16,17).

$$\text{Partition number (PN)} = \text{total number of carbon (CN)} - 2 \times \text{total number of double bond (ND)}$$

Tocopherol 및 γ-oryzanol 정량 분석

시료의 전처리를 위해 50 mL vial에 1 g의 시료를 취한 후 산화 방지를 위해 5 mL의 6% pyrogallol 에탄올 용액과 1.25 mL의 60% KOH 용액을 가하여 균질화하고 비누화시켰다. 산화 방지를 위해 충분한 질소 충전 후 완전히 밀봉하여 70°C로 유지된 항온교반수조에서 30분간 반응 후 ice box를 이용하여 냉각하였다. 5 mL의 2% NaCl용액을 첨가하고 2.5 mL의 hexane : ethyl acetate=85:15(0.05% BHT함유)를 넣고 총 3회 반복추출 후 질소를 이용하여 용매를 완전히 제거하였다. 이에 5 mL의 헥산으로 희석하여 syringe filter(13 mm, 0.2 μm, Whatman®, USA)를 이용하여 여과 후 tocopherol 분석 시에는 20 μL, oryzanol 분석 시에는 10 μL를 주입하여 HPLC 분석을 실행하였다. HPLC는 SP930D dual pump와 UV730 검출기(Young-Lin Instrument Co., Ltd.)로 구성되어 있고, tocopherol과 oryzanol 분석은 각각 295와 325 nm에서 실시하였다. Column은 LiChrosorb Diol 5 μm(3×100 mm, Chrompack, Raritan, NJ, USA)을 사용하였다. Tocopherol 분석 시 유속은 0.5 mL/min, 이동상은 100:0.1(v/v)의 hexane : acetic acid를 등용리로 유지하여 분석을 실시하였다. 한편 γ-oryzanol 분석의 이동상은 기울기 용리로써 10분까지는 hexane : acetic acid(100:0.1)를 100% 흘려주다가 이후 22분까지는 hexane : isopropanol (99:1) 100%로 흘려준 후, 다시 초기상태로 라인을 흘려주었다. α-, γ-, δ-tocopherol 및 γ-oryzanol 표준물질 분석을 통해 시료 중의 tocopherol과 γ-oryzanol 함량을 정량하였고, 특히 토코페롤은 빛이나 열에 민감하므로 유의하여 분석을 실행하였다.

Phytosterol의 정량 분석

반응에 사용된 기질 및 효소적 합성을 통해 얻어진 각각의 시료 25 mg에 2 mL의 2 N KOH 에탄올용액과 내부 표준물질로서 50 μL의 5α-cholestane(1 mg/mL)을 가한 후, 90°C로 설정된 항온수조에서 15분간 비누화 시켜주었다. 비누화 반응 후 1 mL의 헥산과 1 mL의 증류수를 가하여 층 분리가 일어나도록 충분히 교반한 후, 상층 액인 헥산 층을 취하였다. 이 과정을 총 3번 반복하여 추출하고, 50 μL의 (BSTFA)+1% TMCS[N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide]를 가해주고, 60°C에서 30분간 반응시켜 주었다. 반응이 끝난 시료의 용매는 질소를 이용하여 완전히 제거해 주고 0.2 mL의 헥산을 가하여준 후, 2 μL를 취하여 GC injection 해주었다. GC 분석에 사용된 column은 ultra-2(25 m×0.25 mm×0.33 μm)이고, detector는 flame ionization detector(FID, Yong-Lin Instrument Co., Ltd.)를 사용하였다. Injector와 detector 온도는 각각 270°C와 290°C로 설정해 주었다. 한편 oven program은 220°C에서 0.5분간, 270°C까지 27분간 그리고 285°C까지 3.5분간 유지시켜 주었고, 온도 상승 비율은 10°C/min로 설정해 주었다.

Texture analyzer를 통한 hardness 측정 및 x-ray diffraction을 통한 결정형 분석

시중 유통 쇼트닝 및 scale-up 반응을 통해 합성된 LTS의 hardness 정도를 측정하기 위해 texture analyzer(TA-XT Ⅱ, Stable Micro system Ltd., UK)를 이용하여 2회 반복 분석하여 결과를 얻었다. Pre speed와 test speed는 1.0 mm/s로, post speed는 2.0 mm/s로 설정하였으며 deformation은 75%로 설정하였다. 또한 45° cylinder probe를 사용하였다. 시료는 약 30 g으로 100 mL 비커의 바닥에서 약 3 cm 높이가 되도록 하였으며 상온에서 24 hr 동안 보관 후 분석을 시행하였다. 분석은 각각 2회 수행하였고, 결과치의 평균값은 SAS program(statistical analysis system, version 8.01)를 이용하여 95% 신뢰구간에서 analysis of variance(ANOVA) 통계처리로 유의성을 검증하였다.

한편, scale-up 반응을 통해 합성된 LTS의 결정형(polymorphic form) 분석은 multipurpose x-ray diffractometer (D/MAX-2200 Ultima/PC, Rigaku International Corporation, Japan)를 사용하여 target은 Cu-Kα, voltage 40 kV 그리고 current 40 mA의 조건으로 회절각도는(2θ) 12~32°로 설정하여 x-ray diffraction pattern을 측정하였다. 분석에 사용된 시료는 상온에서 24 hr 동안 보관한 뒤 사용하였다.

결과 및 고찰

지방산 조성 분석

Scale-up 반응을 통하여 생성된 LTS와 비교 군으로 사용된 시중 유통 쇼트닝(commercial shortening)의 지방산 조성은 Table 1에 나타내었다. 본 실험에서 사용된 시중 유통 쇼트닝의 주요 지방산 조성을 살펴보면, 35.7 wt%의 C16:0 (palmitic acid), 40.1 wt%의 C18:1(oleic acid) 및 9.4 wt%의 C18:0(stearic acid)으로 나타났고, 총 포화지방산(ΣSFA) 함량과 총 불포화지방산(ΣUSFA) 함량은 각각 47.0과 48.2 wt%로 나타났으며, 총 트랜스지방 함량은 4.8 wt%로 다소 높게 측정되었다. 또한 sn-2 position 분석결과, 주요 지방산은 C16:0(17.5 wt%), C18:1(63.8 wt%) 및 C18:2(12.7 wt%)로 나타났고, sn-1,3 position에는 C16:0(45.0 wt%), C18:0 (11.9 wt%) 및 C18:1(28.9 wt%)로 측정되었다.

한편, LTS의 주요 지방산 조성인 33.7 wt%의 C16:0, 45.7 wt%의 C18:1 및 13.4 wt%의 C18:2가 전체 지방산 조성의 90% 이상 차지하는 것을 확인할 수 있었고, 총 트랜스지방산은 0.5 wt%로 미량 검출되었다. 이러한 트랜스지방 함량은 Yella Reddy와 Jeyarani(18)의 논문과 비교(18:1 trans; 17.5~28.9%)하였을 때, 현저히 낮은 수치로서 시중 유통 저트랜스 쇼트닝으로 사용하기에 적합한 것을 확인할 수 있었다. 또한 ΣSFA는 40.0 wt%로 측정되어 시중 유통 쇼트닝의 ΣSFA(47.0 wt%)보다 낮은 수치를 확인할 수 있었다.

Table 1. Fatty acid composition of commercial shortening and low-trans shortening (LTS)

FA (wt%)	Commercial shortening			LTS		
	TAG	sn-2	sn-1,3	TAG	sn-2	sn-1,3
14:0	1.7±0.0	2.3±0.0	1.4±0.0	0.7±0.0	0.8±0.0	0.7±0.0
16:0	35.7±0.0	17.5±0.7	45.0±0.4	33.7±0.1	36.6±0.5	32.3±0.2
16:1	1.0±0.0	1.6±0.0	0.7±0.0	0.1±0.0	–	0.2±0.0
18:0	9.4±0.0	4.5±0.2	11.9±0.1	5.0±0.0	5.9±0.2	4.6±0.2
18:1	40.1±0.0	63.8±1.5	28.9±0.8	45.7±0.1	43.5±0.8	46.9±0.3
18:2	6.9±0.0	12.7±0.6	4.2±0.3	3.4±0.1	12.7±0.1	13.7±0.1
18:3	0.2±0.0	–	0.3±0.0	0.3±0.0	–	0.5±0.0
20:0	0.3±0.0	–	0.5±0.0	0.5±0.0	0.5±0.0	0.4±0.0
18:1trans	4.2±0.0	–	6.3±0.0	0.2±0.0	–	0.3±0.0
18:2trans	0.6±0.0	–	0.8±0.0	0.3±0.0	–	0.4±0.0
Σtrans FA	4.8±0.0	–	7.1±0.0	0.5±0.0	–	0.7±0.0
ΣSFA[1)]	47.0±0.0	23.8±0.3	58.7±0.5	40.0±0.0	43.8±0.2	38.0±0.3
ΣUSFA[2)]	48.2±0.0	76.2±0.8	34.1±0.5	59.5±0.0	56.2±0.5	61.2±0.3

[1)]Total saturated fatty acid. [2)]Total unsaturated fatty acid.

Table 2. Solid fat contents (%) of commercial shortening and low-trans shortening (LTS) obtained from differential scanning calorimetry

Temp. (°C)	Commercial shortening	LTS
-10	91.20	90.13
-5	83.63	82.34
0	72.46	71.62
5	59.37	54.96
10	50.26	40.65
15	45.18	30.09
20	43.43	28.39
25	31.09	23.09
30	19.12	16.28
35	9.56	8.77
40	1.61	0.86
45	0.01	0.01
Slip M.P (°C)	35.5	34.8

Sn-2 position에 위치한 지방산 조성 분석 결과 주로 C16:0 (36.6 wt%), C18:1(43.5 wt%) 및 18:2(12.7 wt%)로 나타났고, sn-1,3 position의 주요 지방산 조성은 C16:0(32.3 wt%)과 C18:1(46.9 wt%)로 측정되었다.

DSC 및 slip melting point 분석

Solid fat content(SFC)는 고체지의 중요한 특성 중 하나로써 물리적인 외관이나 spreadability를 비롯하여, 특히 33~38°C 사이의 온도에 해당하는 입 안에서의 느낌(mouth feel)에 영향을 주며 베이커리 제품의 품질을 평가하는데 유용하게 사용되고 있다(19). Table 2에는 시중 유통 쇼트닝과 대량 합성된 저트랜스 쇼트닝(LTS)의 SFC 결과를 나타내었다. 고체지는 입안에서의 녹는 감각적인 특성이 중요하고, 대부분 상온에서 보관하며 사용하기 때문에 30~35°C의 범위에서 비교하였을 때, 시중 유통 쇼트닝의 SFC는 19.12 (30°C), 9.56(35°C)%로 분석되었고, LTS의 SFC는 16.28 (30°C), 8.77(35°C)%로 측정되어 두 시료 간의 SFC 함량 변화가 비교적 유사함을 확인할 수 있었다. 한편, 시중 유통 쇼트닝과 LTS의 slip melting point는 각각 35.5와 34.8°C로 서로 유사하게 측정되어 이번 실험을 통해 합성된 LTS는 상업적 목적으로 사용하기에 적합한 물성을 가질 것으로 생각된다. 또한 시중 유통 쇼트닝과 LTS의 differential scanning calorimetry(DSC)를 통한 발열곡선 및 흡열곡선 분석을 실시하였다(Fig. 1). 시중 유통 쇼트닝은 0~40°C의 범위 중 각각 2.5, 10.2, 24.5, 38.6°C에서 흡열 피크를 나타내었고, 대량합성을 통해 생성된 LTS는 네 개의 흡열 피크를 보이며 각각 0.0, 12.8, 22.1, 36.4°C로 측정되어 두 시료 간에 유사한 온도 범위를 나타낸 것을 알 수 있었다. 한편, 두 시료의 발열곡선 결과를 살펴보면, commercial shortening의 경우 -1.5, 16.0°C에서 발열피크를 나타내었고, LTS의 발열피크 -2.0, 16.2°C에서 두 개의 피크를 보이며 비교적 유사한 온도 범위를 나타내며 측정되었다.

Reverse-phase HPLC를 이용한 TAG 조성 분석

합성반응에 사용된 기질 및 합성된 저트랜스 쇼트닝

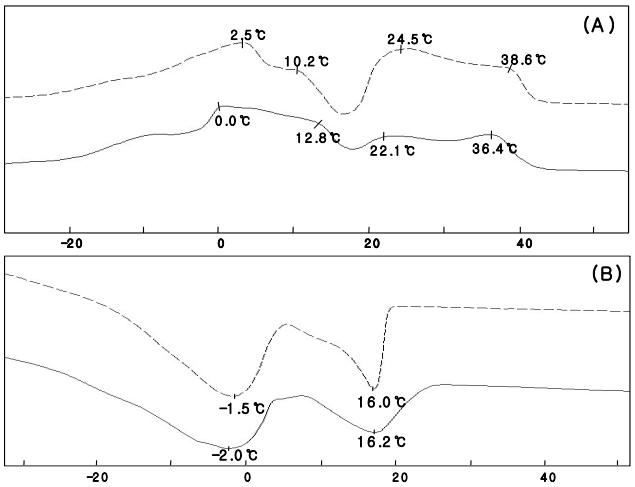

Fig. 1. Differential scanning calorimetry (DSC) endothermic heat flow (A) and exothermic heat flow (B) of commercial shortening and low-trans shortening (LTS).
------ Commercial shortening, —— LTS

(LTS)의 triacylglycerol(TAG) 조성을 reverse-phase HPLC를 이용하여 분석하였다(Fig. 2). 분석 결과 미강유(RBO)의 주요 TAG 조성은 OOL, PLO, OOO, POO(O=oleic acid, P=palmitic acid, L=linoleic acid) 등이고, 팜스테아린(PS)은 POO, PPP, POP 등으로 이루어졌으며, 고올레인산 해바라기씨유(HO)의 경우는 전체 TAG조성의 약 90% 정도가 OOO로 이루어졌음을 확인할 수 있었다. Scale-up 반응을 통해 합성된 LTS의 주요 TAG 조성으로는 POO, POP, PLO 등으로 확인되었는데, 반응 전과 반응 후의 TAG 조성을 비

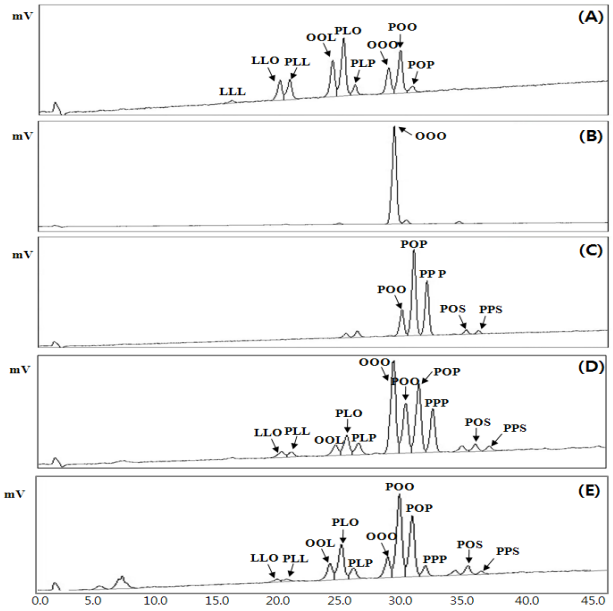

Fig. 2. Chromatograms from the RP-HPLC separation of rice bran oil (A), high oleic sunflower seed oil (B), palm stearin (C), before reaction (D) and after reaction (LTS[1)], E).
[1)]Low-trans shortening.

Table 3. Peaks classified by partition number (PN) in RBO[1)], PS[2)], and HO[3)] before reaction and after reaction (LTS[4)])

(area%)

		RBO	PS	HO	Before reaction	After reaction (LTS)
PN=42	LLL	1.17	–	–	–	–
PN=44	LLO	9.53	–	–	1.99	1.11
	PLL	10.82	–	–	1.70	1.06
PN=46	OOL	14.68	–	1.27	3.58	6.04
	PLO	22.92	2.88	–	6.44	13.05
	PLP	4.61	5.31	–	3.89	4.10
PN=48	OOO	12.08	–	91.27	27.65	6.97
	POO	19.66	13.33	4.37	15.94	29.05
	POP	4.08	44.17	–	21.17	21.18
	PPP	–	29.84	–	11.97	3.36
PN=50	POS	–	2.34	–	2.16	3.21
	PPS	–	1.72	–	1.42	1.13

[1)]RBO: rice bran oil. [2)]PS: palm stearin. [3)]HO: high oleic sunflower seed oil. [4)]Low-trans shortening.

교해 보면(Table 3), OOO와 PPP의 area%는 각각 27.65에서 6.97 area%로, 11.97에서 3.36 area%로 감소한 반면 POO는 15.94에서 29.05 area%로, PLO는 6.44에서 13.05 area%로 증가되었다. 이는 반응 중에 효소에 의해 기질 자체의 지방산이 선택적으로 재배열되어 TAG 조성의 변화가 일어난 것이라 추정된다.

한편, 합성반응에 사용된 기질 및 합성된 저트랜스 쇼트닝(LTS)을 구성하는 지방산들의 길이 및 불포화도에 따라 분리하여 PN(partition number)을 분석하였다(Table 3). 미강유의 PN은 42~48의 범위에 고르게 분포하였고, 팜스테아린의 PN은 46~50의 범위에서 나타났는데, 특히 전체 TAG 조성 중 PN=48이 87.34 area%를 차지하였다. 고올레인산 해바라기씨유의 경우, 95.64 area%가 PN=48에 위치하고 있었다. 또한 반응 전 시료와 반응 후 시료(LTS)의 PN을 비교해보면, 합성된 저트랜스 쇼트닝의 경우, PN=46이 반응 전(13.91 area%)에 비해 9.28 area% 높아진 수치(23.19 area%)를 보였고, 반면 PN=48은 반응 전(76.73 area%)에 비해 16.17 area% 감소한 수치인 60.56 area%로 나타났다. 이로써 기질 사이의 효소적 interesterification 반응이 이루어졌음을 알 수 있었다.

Tocopherol, γ-oryzanol 및 phytosterol 분석

Scale-up 반응을 통해 합성된 저트랜스 쇼트닝(LTS)의 α, γ, δ-tocopherol 및 γ-oryzanol 함량을 분석하였다(Table 4). 분석결과, LTS의 total tocopherol 함량은 12.37 mg/100 g으로 나타났고, 그 중 α-tocopherol은 11.22 mg/100 g, β-tocopherol은 1.14 mg/100 g으로 측정되었으며, δ-tocopherol은 검출되지 않았다. 또한 LTS의 γ-oryzanol 함량 분석 결과, 0.43 mg/100 g으로 나타났다. 한편, LTS의 phytosterol 함량을 살펴보면(Table 4), campesterol이 64.07 mg/100 g, stigmasterol이 39.91 mg/100 g 그리고 β-sitosterol이 147.40으로 측정되어 총 phytosterol 함량은 251.38 mg/100 g임을 알 수 있었다.

Table 4. Tocopherol, γ-oryzanol, and phytosterol contents of low-trans shortening

		Low-trans shortening (mg/100 g)
Tocopherol	Total	12.37
	α-Tocopherol	11.22
	γ-Tocopherol	1.14
	δ-Tocopherol	ND[1)]
γ-Oryzanol		0.43
Phytosterol	Total	251.38
	Campesterol	64.07
	Stigmasterol	39.91
	β-Sitosterol	147.40

[1)]ND: not detect.

Hardness 및 결정형 분석

시중 유통 쇼트닝과 scale-up 반응을 통해 합성된 저트랜스 쇼트닝(LTS)의 texture analyzer를 통한 hardness 측정 결과는 Fig. 3에 나타내었다. 상온에서 24 hr 보관 후 측정한 결과 commercial shortening은 157.41 g, LTS는 157.00 g으로 두 시료의 hardness가 비교적 유사하게 측정되었고, 유의성 검증 결과 또한 $p>0.05$로 나타나 유의성 차이가 없는 것으로 확인되었다. 이에 본 연구에서 합성된 반응물인 LTS는 shortening으로 사용할 경우 적합한 물성을 기대할 수 있을 것으로 생각된다.

한편, x-ray diffraction 분석기기로부터 scale-up 반응을 통해 합성된 저트랜스 쇼트닝(LTS)의 polymorphic form 결과를 얻을 수 있었다(Table 5). 유지의 결정형은 쇼트닝과 마가린의 물성과 품질에 여러 가지 영향을 미치게 되는데, 예를 들면 쇼트닝의 상품 가치를 저하시키는 입상화는 동질이상현상과 밀접한 관계가 있고, 초콜릿, 버터크림 제조 시 크림성에 영향을 준다. 일반적으로 유지의 결정형은 단일 결정형을 취하지 않고 주로 α, β′, β의 3종으로 대별되는

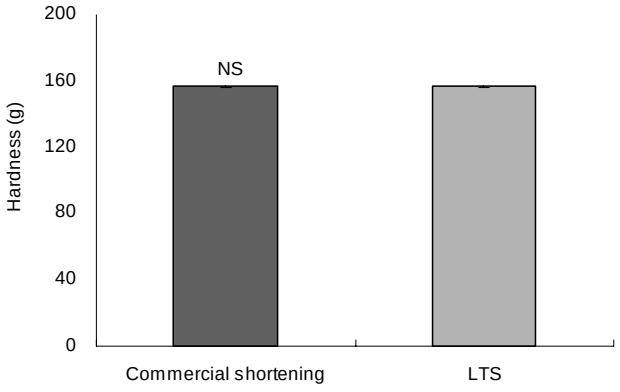

Fig. 3. Hardness of commercial shortening and low-trans shortening (LTS) stored at room temperature.
NS: not significant.

Table 5. Polymorphic form of low-trans shortening (LTS)

Diffraction angle (2Θ)	d[1)] (Å)	Area%	Polymorphic form
19.0	4.66	34.17	β
19.4	4.57	22.05	β′+β
20.3	4.38	23.68	β′
21.0	4.23	5.01	β′
23.1	3.85	15.09	β′

[1)]d: inter planar spacing.

결정형을 가진다. Larsson(20)의 연구에 따르면, 불안정한 상태인 α형은 4.15Å에서 short spacing을 보이고, β′형은 4.2 와 3.8Å에서 강한 short spacing을 보이며 4.27, 3.97 및 3.71Å에서 약한 short spacing을 보인다고 보고하였다. 또한 매우 안정한 결정형인 β형은 4.60Å에서 강한 short spacing을 나타낸다고 보고하였다. 일반적으로 쇼트닝이나 마가린은 β′형 결정일 때 바람직하다고 여겨지는데, LTS의 x-ray diffraction 결과를 살펴보면, β형이 함께 공존하고 있지만 β′형이 우세하게 나타나고 있었다.

요 약

미강유(RBO), 팜스테아린(PS), 고올레인산 해바라기씨유(HO)를 기질로 사용하여 24 hr, 65°C의 조건하에 회분식 반응기(batch type reactor)에서 TLIM을 이용한 interesterification을 통해 생성된 저트랜스 쇼트닝의 이화학적 특성을 살펴보았다. DSC 분석결과를 살펴보면, SFC 함량 변화는 commercial shortening과 low-trans shortening(LTS) 간에 거의 유사하게 측정되었고, slip melting point는 각각 35.5, 34.8°C로 나타났다. 지방산 조성 분석 결과, LTS는 전체 지방산 조성의 90% 이상이 C16:0(33.7 wt%), C18:1(45.7 wt%), C18:2(13.4 wt%)로 구성되어 있으며 이 중 트랜스지방산은 시중 유통 쇼트닝보다 3배 이상 적은 0.5 wt%로 미량 검출되었다. Sn-2 position에 위치한 지방산 조성은 C16:0이 36.6 wt%, C18:1이 43.5 wt%로 나타났다. LTS의 주요 TAG 조성으로는 POO, POP, PLO 등으로 나타났고, 반응 전과 반응 후의 TAG 조성을 비교해 보면, OOO와 PPP의 area%는 각각 27.65에서 6.97 area%로, 11.97에서 3.36 area%로 감소한 반면 POO는 15.94에서 29.05 area%로, PLO는 6.44에서 13.05 area%로 증가되었다. α, γ, δ-Tocopherol 분석 결과 LTS의 total tocopherol은 12.37 mg/100 g, γ-oryzanol 함량은 0.43 mg/100 g을 나타냈으며, total phytosterol 함량은 251.38 mg/100 g으로 나타났다. Commercial shortening과 LTS의 texture analyzer를 통한 hardness 측정 결과, commercial shortening은 157.41 g, LTS는 157.00 g으로 두 시료의 hardness가 비슷하게 측정되었다. LTS의 polymorphic form을 측정하기 위해 x-ray duffraction을 사용하였다. 일반적으로 쇼트닝이나 마가린은 β′형 결정일 때 바람직하다고 여겨지는데, LTS의 분석 결과 β형이 함께 공존하고 있지만, β′형이 우세하게 나타났다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 현장협력기술개발사업(과제번호: 20070401080019호)의 지원에 의해 이루어진 것입니다.

문 헌

1. Bethesda MD. 1996. Position paper on trans fatty acids. *Am J Clin Nitr* 63: 663-670.
2. Lichtenstein AH. 1998. Trans fatty acid and blood lipid levels, LP(a), parameters of cholesterol metabolism, and hemostatic factors. *J Nutr Biochem* 9: 244-248.
3. Park JM, Ji WG, Kim EJ, Park DJ, Shin JH, Shim SM, Suh HJ, Chang UJ, Kang DH, Kim JM. 2007. Analysis of trans fatty acid content in processed foods and meat products. *Kor J Food Sci Ani Resour* 27: 531-537.
4. IUFoST News. 2007. International union of food science and technology scientific council information bulletin #4-trans fatty acids. *LWT-Food Sci Technol* 40: 383-387.
5. 식품의약품안전청. 2007. 2004-2006년 트랜스지방 모니터링 결과.
6. Lee KT, Akoh CC. 1998. Structure lipids: synthesis and applications. *Food Rev Int* 14: 17-34.
7. Lee KT, Foglia TA, Lee JH. 2005. Low-calorie fat substitutes: synthesis and analysis. In *Handbook of industrial biocatalysis*. Hou C, ed. CRC Press, FL, USA. Vol 16, p 1-19.
8. Karabulut I, Turan S, Ergin G. 2004. Effects of chemical interesterification on solid fat content and slip melting point of fat/oil blends. *Eur Food Res Tech* 218: 224-229.
9. Zhang H, Pedersen LS, Kristensen D, Adler-Nissen J, Holm HC. 2004. Modification of margarine fats by enzymatic interesterification: evaluation of a solid-fat-content-based exponential model with two groups of oil blends. *J Am Oil Chem Soc* 81: 653-658.
10. Farmani J, Hamedi M, Safari M, Madadlou A. 2007. *Trans*-free iranian vanaspati through enzymatic and chemical transesterification of triple blends of fully hydrogenated soybean, rapeseed and sunflower oils. *Food Chem* 102: 827-833.

11. Kwon KS, Choi KS, Kim HK. 1996. Comparative studies on the composition of pola lipids in japonica and indica rice bran oils. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 25: 735-740.
12. Lee KT, Akoh CC. 1997. Effects of selected substrate forms on the synthesis of structured lipids by two immobilized lipases. *J Am Oil Chem Soc* 74: 579-584.
13. Kim IH, Kim H, Lee KT, Chung SH, Ko SN. 2002. Lipase-catalyzed acidolysis of perilla oil with caprylic acid to produce structured lipids. *J Am Oil Chem Soc* 79: 363-367.
14. 식품의약품안전청. 2007. 식품 등 기준규격 미설정 물질의 시험방법. 식품의약품안전청고시 제2007-10호.
15. Fomuso LB, Akoh CC. 2003. Lipase-catalyzed acidolysis of olive oil and caprylic acid in a bench-scale packed bed bioreactor. *Food Res Int* 35: 15-21.
16. Lee KT, Foglia TA. 2000. Synthesis, purification and characterization of structured lipids produced from chicken fat. *J Am Oil Chem Soc* 77: 1027-1034.
17. Lee KT, Jones KC, Foglia TA. 2002. Separation of structured lipids by high performance liquid chromatography. *Chromatographia* 55: 197-201.
18. Yella Reddy S, Jeyarani T. 2001. Trans-free bakery shortenings from mango kennel and mahua fats by fractionation and blending. *J Am Oil Chem Soc* 78: 635-340.
19. Criado M, Hernandez-Martin E, Lopez-Hernandez A, Otero C. 2007. Enzymatic interesterification of extra virgin olive oil with a fully hydrogenated fat: characterization of the reaction and its products. *J Am Oil Chem Soc* 84: 717-726.
20. Larsson K. 1966. Classification of glyceride crystal forms. *Acta Chem Scand* 20: 2255-2260.

(2009년 1월 8일 접수; 2009년 2월 17일 채택)