J Korean Soc Food Sci Nutr
40(8), 1113~1120(2011)

한국식품영양과학회지
http://dx.doi.org/10.3746/jkfn.2011.40.8.1113

팜중부유를 이용한 대칭형 Palmitoyl-Oleoyl-Stearoyl Triacylglycerol의 효소적 합성 반응 연구

이선모 · 신정아 · 홍순택 · 이기택†
충남대학교 식품공학과

A Study of the Enzymatic Interesterification Reaction for Producing Palmitoyl-Oleoyl-Stearoyl Triacylglycerol from the Palm Mid Fraction

Seon-Mo Lee, Jung-Ah Shin, Soon-Tack Hong, and Ki-Teak Lee†
Dept. of Food Science and Technology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

Abstract

Enzymatic interesterification was conducted with the palm mid fraction (PMF) and stearic ethyl ester for 1, 5, and 9 hr at 46°C. The reaction was catalyzed by Lipozyme TLIM (2, 3, and 4% by weight of total substrates) in a shaking water bath at 180 rpm. As the reaction continued, oleic acid (C18:1) content at the sn-2 position decreased, whereas saturated fatty acid (C16:0 and C18:0) content increased. In the high performance chromatography analysis, 1,3-dipalmitoyl-2-oleoyl glycerol content decreased, whereas 1(3)-palmitoyl-2-oleoyl-3(1)-stearoyl glycerol (POS) content increased up to the reaction equilibrium. The rate of acyl migration increased with increasing molar ratio and enzyme load as well as reaction time. The optimal reaction conditions for maximizing POS content (53.5 area%) and minimizing acyl migration (23.1 area%) were obtained with a PMF : stearic ethyl ester=1:2 (molar ratio), Lipozyme TLIM 3 wt%, and a reaction time of 5 hr.

Key words: enzymatic interesterification, palm mid fraction, acyl migration, 1(3)-palmitoyl-2-oleoyl-3(1)-stearoyl glycerol

서 론

코코아 버터(cocoa butter)는 초콜릿 제조와 더불어 제과 산업 등에 있어 중요한 원료로 이용되고 있다(1). 코코아 버터의 주요 triacylglycerol(TAG) 조성은 1,3-dipalmitoyl-2-oleoyl glycerol(POP, 13~19%), 1(3)-palmitoyl-2-oleoyl-3(1)-stearoyl glycerol(POS, 36~42%), 1,3-distearoyl-2-oleoyl glycerol(SOS, 23~29%)로 대부분이 포화(saturated)-불포화(unsaturated)-포화(saturated)인 대칭형 구조를 이루고 있다(2). 이와 같은 특징적 대칭구조는 상온에서 단단하지만 쉽게 부서지고, 입안에서 완전히 녹는 구용성과 같은 용융 특성과 관련이 깊다(2,3). 한편, 코코아 버터는 수요에 비해 공급이 한정되어 있으므로 이를 대체하기 위한 코코아 버터 대용지(cocoa butter equivalents, CBE) 개발 연구가 다양하게 진행되어 왔다(4). 코코아 버터 대용지(CBE)는 코코아 버터와 물리·화학적 성질은 유사하지만 코코아 콩 이외의 것에서 얻어진 것을 말하며, 고급 초콜릿의 일부 또는 전체적으로 대신하여 관련제품에 이용될 수 있다(5). 코코아 버터 대용지를 제조하는데 있어 주로 이용되는 방법으로는 에스테르 교환반응(interesterification)을 들 수 있으며 이를 통해 글리세롤에 결합되어 있는 지방산의 조성 및 위치를 무작위 또는 선택적으로 변화시킬 수 있어 물리화학적, 영양학적 특성을 부여한 새로운 유지를 합성할 수 있다(6). 일반적으로 식품산업에서는 고온, 고압 및 무기촉매를 이용한 화학적 에스테르 교환반응이 이루어졌으나 합성 및 정제 과정 중 발생하는 변색, 이취 및 불포화 지방산에 있어 바람직하지 않은 중합체 형성 등의 부반응을 일으킴에 따라 이를 대체하기 위한 효소를 이용한 에스테르 교환반응의 연구가 활발히 진행되고 있다(7). 효소적 에스테르 교환반응은 중성지방의 지방산에 대해 기질특이성이 있는 촉매인 lipase/esterase를 이용함으로써 무기촉매를 사용하는 방법에 비해 동질성이 높은 고순도의 유지를 제조할 수 있다(8). 또한 비교적 온화한 반응 조건에서 이루어지므로 에너지 소비가 적으며 부반응이 일어나지 않기 때문에 친환경적이고, 회수가 용이하여 재사용이 가능한 이점들이 있다(9).

그러나 효소를 촉매로 한 에스테르 교환반응이 진행될 경우 acyl migration 현상이 발생한다고 알려져 있다. 일반적으로 TAG의 sn-1,3 위치에서 sn-2 위치로 acyl migration

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

이 진행되거나 sn-2 위치에서 sn-1,3 위치로의 이동도 일어나게 된다. 이러한 acyl migration은 열역학적인 과정이므로 가장 중요하게 고려되어야 할 요소는 반응 온도로 알려져 있다(10). 또한 acyl migration은 수분함량, 효소 투입량, 반응시간, 반응기의 종류 및 상태 등에 의하여 영향을 받게 되는데 특히 대칭 구도를 갖는 재구성지질의 합성 시에 반응물의 순도를 감소시킨다는 결과가 보고된 바 있다(11).

팜유(palm oil)는 식용유, 마가린, 쇼트닝을 비롯하여 제과제품 생산에도 널리 이용되고 있는 대표적인 식품 소재이다. 다른 식물유에 비해 포화지방산인 palmitic acid(C16:0)를 약 40% 함유하고 있어 높은 융점과 우수한 산화 안정성을 가진 것이 특징이다(12,13). 팜유를 구성하고 있는 주요 TAG 성분은 POP로 약 35~40%를 차지하고 있으며 분별(fractionation)을 통해 POP가 70~80% 함유된 팜중부유(palm mid fraction, PMF)를 얻을 수 있다(14). 팜유의 분별공정으로써 크게 저융점(low melting)의 액체 부분인 팜올레인(palm olein)과 고융점(high melting)의 고체 부분인 팜스테아린(palm stearin)으로 나누어 얻을 수 있다. 팜올레인은 액상 튀김유로 이용되나, 팜스테아린의 경우 마가린이나 쇼트닝 등에 주로 사용되고 있다(15). 팜중부유는 cocoa butter equivalents(CBE) 생산에 있어 다른 유지와의 혼합(blending)을 통해 코코아 버터와 유사한 물리 화학적 특성을 부여할 수 있다(16).

본 연구에서는 주요 TAG 성분이 POP인 PMF와 stearic ethyl ester를 기질로 TAG의 1,3-위치에 특이적으로 작용하는 고정화 효소인 Lipozyme TLIM을 이용한 에스테르 교환반응을 실시하였다. 기질의 몰 비율 및 효소의 양, 반응 시간을 서로 다르게 하여 반응하였을 때 stearoyl기 결합에 따른 POS의 구성율 및 TAG 조성 변화와 더불어 acyl migration 정도를 알아보았다. 반응을 통하여 얻을 수 있는 TAG 형태는 주로 palmitic acid(C16:0, P), stearic acid(C18:0, S), oleic acid(C18:1, O)로 구성되어 있는 대칭형 구조인 POS와 SOS를 포함하고 있을 것으로 예상하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용된 PMF는 C사(Seoul, Korea)에서 제공받았으며 순도가 90% 이상인 stearic ethyl ester는 (주)네오메가(Daejeon, Korea)에서 제공받은 것을 사용하였다. Interesterification을 통한 재구성 지질의 합성에 사용된 효소는 Lipozyme TLIM으로 *Thermomyces lauginosus*로부터 획득한 lipase를 silica gel에 고정화시킨 것으로서 Novozymes Co.(Krogshoejvej, Bagsvaerd, Denmark)의 제품을 사용하였다. 지방산 분석에 사용된 10% BF_3 메탄올 용액은 Supelco(Bellefonte, PA, USA)에서 구입하였고, sn-2 position의 지방산 조성 분석에 사용된 pancreatic lipase(Type Ⅱ, crude)는 Sigma-Aldrich Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입한 것을 사용하였다. 모든 기기분석에는 HPLC grade 용매를 사용하였다.

POS 형태 TAG 분자의 효소적 합성

기질의 몰 비율과 효소 투입량 및 시간에 따른 반응 결합률을 알아보기 위하여 PMF와 stearic ethyl ester를 1:1, 1:1.5, 1:2, 1:3 몰비율로 반응하였다. Screw-cap flask(250 mL)에 각각의 몰 비율에 해당하는 기질을 넣고 혼합한 후 기질 총량 대비 2, 3, 4 wt%에 해당하는 고정화 효소 Lipozyme TLIM(수분 활성도 <0.1)을 넣고 항온교반수조(46°C)에서 180 rpm의 속도로 반응하였다. 시간에 따른 반응 결합률을 알아보기 위하여 1, 5, 9시간마다 반응물을 취한 후 PTFE syringe filter(0.5 μm)를 이용하여 여과한 후 분석하였다.

지방산 조성 분석

지방산 분석을 위하여 methylation을 한 후 gas chromatography(GC) 분석을 실시하였다. Methylation은 시료 약 25 mg을 취하여 test tube에 넣고 1.5 mL의 0.5 N NaOH 메탄올 용액을 가한 후 충분히 혼합하였다. 이후 100°C 항온수조에서 5분 동안 반응시킨 후 1~2분 냉각하였으며, 2 mL의 10% BF_3 메탄올 용액을 가한 후 다시 2분간 반응시켜 1~2분 냉각하였다. 여기에 iso-octane 2 mL과 1 mL의 포화 NaCl 용액을 넣고 충분히 교반 후, 2분간 방치하여 상층액을 취하였다. 분리한 상층액을 anhydrous sodium sulfate column에 통과시켜 수분 및 불순물을 제거한 후 GC(Hewlett-Packard 6890 series, Avondale, PA, USA)로 분석하였다. Column은 SP™-2560(100 m×0.25 mm, 0.2 μm film thickness, Supelco, Bellefonte, PA, USA)을 이용하였으며 검출기는 flame ionized detector(FID)를 사용하였고, 온도는 260°C로 설정하였다. Injector의 온도는 250°C를 유지하였고, carrier gas는 질소가스를 flow rate 52.5 mL/min로 설정하여 사용하였다. Oven 온도는 150°C에서 5분간 유지 후 4 °C/min 승온으로 220°C까지 도달하여 30분간 유지하였고, 시료는 1 μL를 주입하여 분석하였으며 split ratio는 50:1이었다. TAG분자의 위치별(sn-1,3과 sn-2) 지방산 조성 분석을 위하여 pancreatic lipase(Sigma-Aldrich Chemical Co.)에 의한 가수분해를 실시하였다. 시험관에 약 7 mg의 시료와 1 M의 Tris-HCl buffer(pH 7.6) 7 mL, 0.05% 담즙산염 1.75 mL, 2.2% $CaCl_2$ 0.7 mL을 첨가한 후 시료의 양과 동일한 양의 pancreatic lipase을 넣고 충분히 vortex 하였다. 항온수조(37°C)에서 3분간 반응 후 1분 동안 충분히 교반하였으며 이와 같은 과정을 3~4회 반복하였다. 반응이 끝난 시료에 diethyl ether를 4 mL 첨가하여 진탕하였고, 상층만 취한 후 sodium sulfate column에 통과시켜 수분 및 불순물을 제거하였다. 전개용매는 n-hexane : diethyl ether : acetic acid의 50:50:1(v/v/v)을 사용하여 TLC(20×20 cm, Merck,

Darmstadt, Germany) 분석을 수행하였으며, TLC silica plate로부터 2-monoacylglycerol(MAG) band 부분만 취하여 앞서 기술한 methylation을 한 후 GC 분석을 실시하였다. 한편, sn-1,3의 지방산 조성은 Fomuso와 Akoh(17)의 계산식을 이용하였으며, 계산식은 다음과 같다.

sn-1,3(%)=[3 TAG(%)−sn-2(%)]/ 2

Reversed-phase HPLC를 이용한 TAG 분석

반응 후 합성된 지질의 TAG 조성 변화를 알아보기 위하여 reversed-phase high performance liquid chromatograph (RP-HPLC) 분석을 실시하였다. SP930D dual pump(Younglin, Seoul, Korea)와 검출기로는 Sedex Model 75 evaporative light scattering detector(ELSD, Dedere, Alfortvill, France)를 55°C와 1.7 bar로 설정하였으며 autosampler (Marathon, Emmen, Netherlands)를 이용하여 분석을 수행하였다. Column은 Nova-Pak® C18 60Å 4 μm(3.9×150 mm i.d., Waters, Milford, MA, USA)를 사용하였으며, 이동상으로는 solvent A(acetonitrile)와 solvent B(iso-propanol : hexane=2:1, v/v)를 사용하여 1 mL/min 유속으로 흘려주었다. 기울기 용리로써 80:20 비율로 45분 동안 흘려준 뒤 54:46의 비율로 15분간 흘려주었으며 80:20으로 변화시켜 65분까지 흘려준 후 70분까지 비율을 유지하였다. 시료 15 mg을 chloroform 20 mL에 녹인 후 PTFE syringe filter(0.5 μm)를 이용하여 여과 후 20 μL를 주입하였다. 분리 후 retention time(RT)와 partition number(PN) 사이의 관계식을 통해 반응생성물 중 새로운 TAG 분자 형태를 분석하였다(18).

Partition number (PN)=total number of carbons (CN) −2×total number of double bonds (ND)

결과 및 고찰

반응 기질의 지방산 조성

본 실험에 반응 기질로 사용된 PMF와 stearic ethyl ester (StEE)의 지방산 조성은 Table 1에 나타내었다. Stearic ethyl ester의 지방산 조성은 94.2 area%의 stearic acid (C18:0)와 5.8 area%의 palmitic acid(C16:0)로 이루어졌으며, PMF의 경우 주요 지방산은 palmitic acid(C16:0)가 57.2 area%, oleic acid(C18:1)가 32.8 area%로 나타났다. 전체 지방산 중 포화지방의 함량은 64.1 area%이었으며, 위치별 지방산 조성 분석 결과 sn-2 위치에는 대부분이 C18:1(81.8 area%)로 구성되어 있음을 확인할 수 있었다. 또한 반응 전 PMF의 총 포화지방산이 11.9 area% 포함되어 있었으며 이들의 대부분은 C16:0이었다.

Table 1. Fatty acid compositions of palm mid fraction (PMF) and stearic ethyl ester (StEE) (Unit: area%)

Fatty acid	StEE	PMF		
	Total[1)]	Total	sn-2	sn-1,3
C14:0	nd[2)]	0.8±0.1	0.4±0.1[3)]	1.0±0.1
C16:0	5.8±0.1	57.2±0.1	10.7±0.1	80.5±0.1
C18:0	94.2±0.1	6.0±0.1	0.9±0.1	8.6±0.1
C18:1	nd	32.8±0.1	81.8±0.1	8.3±0.1
C18:2	nd	3.1±0.1	6.3±0.1	1.5±0.1
∑SFA[4)]	100±0.1	64.1±0.1	11.9±0.1	90.2±0.1
∑USFA[5)]	nd	35.9±0.1	88.1±0.1	9.8±0.1

[1)]Total fatty acid composition.
[2)]Not detected.
[3)]All values are mean±SD (n=2).
[4)]Sum of saturated fatty acids.
[5)]Sum of unsaturated fatty acids.

몰 비율, 시간과 효소양에 따른 위치별 지방산 조성

효소 합성을 통해 얻은 반응물의 acyl migration 정도를 알아보기 위하여 각각의 반응기질의 몰 비율 1:1, 1:1.5, 1:2, 1:3(PMF : StEE)에서 효소 투입량과 반응시간에 따른 sn-2 위치별 지방산 조성을 분석하였다(Table 2, 3). 효소의 양과 반응 시간이 동일할 때 몰 비율 증가에 따른 palmitic acid (C16:0)와 stearic acid(C18:0), oleic acid(C18:1) 함량에는 약간의 차이를 보였다. 예를 들면 각각의 반응 후, 반응물 sn-2 위치의 C16:0 함량은 효소양 4 wt%, 반응시간 9시간의 조건이 일정할 경우에서 반응기질의 몰 비율이 1:1에서 1:1.5 로 증가함에 따라 각각 22.9와 20.5 area%를 나타내었으며 몰 비율이 1:2와 1:3에서는 18.6과 17.9 area%를 유지하였다. C18:0의 경우에는 1:2에서 1:3으로 몰 비율이 높아지면서 15.1에서 19.2 area%로 증가하였다. 또한, 3 wt%의 효소양과 5시간의 반응에서의 C18:1 함량은 반응기질의 몰 비율이 1:1에서 1:3으로 증가함에 따라 약 7.5 area%까지 감소한 67.7 area%를 나타내었다. 한편, 반응물 sn-2 위치의 C18:1 함량은 본 실험에서 진행된 반응조건에서 1:3의 몰 비율 (PMF : StEE), 4 wt%의 효소양, 그리고 9시간의 반응에서 가장 낮은 57.4 area% 함량을 보였는데 이는 원래 기질인 PMF의 sn-2 위치의 C18:1 함량으로부터 약 24.4 area% 감소한 수치이었다.

반응 효소 양을 달리하였을 때 sn-2 위치 구성 지방산의 함량 변화는 주로 5시간과 9시간 반응에서 보였다. 반응기질의 몰 비율이 1:1이고 9시간 반응 시에 효소양이 2 wt%에서 4 wt%로 증가함에 따라 반응물 sn-2 위치의 C16:0은 약 5.9 area% 증가하였고, C18:1의 경우에는 8.4 area% 감소하였다. C18:0의 함량은 몰 비율 1:1.5이고 5시간 반응에서 효소양이 3 wt%에서 4 wt%로 증가했을 때 약 1.9배 증가한 11.4 area%를 나타내었다. 특히 반응물 sn-2 위치의 C16:0과 C18:0 사이의 함량 변화는 본 실험에서 수행된 반응 조건 중에서 가장 큰 반응 기질의 몰 비율(1:3) 및 가장 많은 효소양(4 wt%)일 때 반응시간이 길어질수록 C16:0보다 C18:0이 더 많은 함량을 차지하였다(Fig. 1). 이때 C18:0은 반응 기질인 PMF의 sn-2 위치에서 0.9 area%를 보였으나 9시간 반응 후에는 반응물 sn-2 위치에 19.2 area%까지 증가된 것을 알 수 있었다(Table 3). 이와 같은 결과는 stearic ethyl ester의 몰비율이 1:1에서 1:3(PMF : StEE)으로 높아지면서 PMF

Table 2. sn-2 composition of reaction product from palm mid fraction (PMF) : stearic ethyl ester (StEE) (1:1 and 1:1.5) at the different enzyme amounts and reaction time (Unit: area%)

PMF : StEE (1:1)[1)]									
Fatty acid	Lipozyme TLIM 2 wt%[2)]			Lipozyme TLIM 3 wt%			Lipozyme TLIM 4 wt%		
	Reaction time (hr)			Reaction time (hr)			Reaction time (hr)		
	1	5	9	1	5	9	1	5	9
C14:0	0.4±0.1[3)]	0.4±0.1	0.4±0.1	0.4±0.1	0.4±0.1	0.4±0.1	0.4±0.1	0.5±0.1	0.4±0.2
C16:0	11.7±0.1	14.2±0.1	17.0±0.1	13.3±0.1	14.4±0.1	19.9±0.1	12.9±0.1	18.3±0.1	22.9±0.1
C18:0	1.6±0.2	3.3±0.1	6.5±0.4	2.0±0.1	5.3±0.1	8.7±0.1	2.6±0.2	5.9±0.1	11.9±0.2
C18:1	80.4±0.1	75.8±0.1	70.6±0.1	78.3±0.1	75.2±0.1	65.7±0.1	78.2±0.1	69.1±0.1	62.2±0.1
C18:2	5.9±0.1	6.0±0.1	5.5±0.1	6.0±0.1	4.7±0.1	5.3±0.1	5.9±0.1	6.2±0.1	4.6±0.2
∑SFA[4)]	13.7±0.1	17.9±0.1	23.9±0.2	15.6±0.1	20.1±0.1	29.0±0.1	16.0±0.1	24.7±0.1	35.2±0.2
∑USFA[5)]	86.3±0.1	81.8±0.1	76.1±0.1	84.4±0.1	79.9±0.1	71.0±0.1	84.0±0.1	75.3±0.1	64.8±0.1
PMF : StEE (1:1.5)[1)]									
Fatty acid	Lipozyme TLIM 2 wt%[2)]			Lipozyme TLIM 3 wt%			Lipozyme TLIM 4 wt%		
	Reaction time (hr)			Reaction time (hr)			Reaction time (hr)		
	1	5	9	1	5	9	1	5	9
C14:0	0.4±0.1	0.5±0.1	0.4±0.1	0.4±0.1	0.4±0.1[3)]	0.5±0.1	0.4±0.1	0.5±0.1	0.4±0.1
C16:0	13.2±0.1	14.5±0.1	17.8±0.1	13.5±0.1	14.8±0.1	18.7±0.1	13.7±0.1	18.2±0.1	20.5±0.1
C18:0	2.2±0.1	5.0±0.3	8.8±0.1	2.6±0.1	6.1±0.1	9.3±0.1	3.3±0.1	11.4±0.1	13.5±0.1
C18:1	77.8±0.1	74.6±0.1	67.3±0.1	77.2±0.1	73.2±0.1	65.6±0.1	77.7±0.1	65.8±0.1	60.2±0.1
C18:2	6.4±0.1	5.5±0.2	5.6±0.1	6.2±0.1	5.5±0.2	5.9±0.1	4.9±0.1	4.1±0.1	5.3±0.1
∑SFA[4)]	15.9±0.1	19.9±0.1	27.0±0.1	16.5±0.1	21.3±0.1	31.5±0.1	17.4±0.1	30.1±0.1	34.4±0.1
∑USFA[5)]	84.1±0.1	80.1±0.1	73.0±0.1	83.4±0.1	78.7±0.1	68.5±0.1	82.6±0.1	69.9±0.1	65.6±0.1

[1)]Molar ratio of palm mid fraction (PMF) with stearic ethyl ester (StEE).
[2)]Amount of Lipozyme TLIM (wt%) was obtained by the weight of substrate mixture.
[3)]All values are described as mean±SD (n=2).
[4)]Sum of saturated fatty acids. [5)]Sum of unsaturated fatty acids.

Table 3. sn-2 composition of reaction product from palm mid fraction (PMF) : stearic ethyl ester (StEE) (1:2 and 1:3) at the different enzyme amounts and reaction time (Unit: area%)

PMF : StEE (1:2)[1)]									
Fatty acid	Lipozyme TLIM 2 wt%[2)]			Lipozyme TLIM 3 wt%			Lipozyme TLIM 4 wt%		
	Reaction time (hr)			Reaction time (hr)			Reaction time (hr)		
	1	5	9	1	5	9	1	5	9
C14:0	0.4±0.1[3)]	0.4±0.1	0.4±0.1	0.4±0.1	0.4±0.1	0.4±0.1	0.4±0.1	0.5±0.3	0.4±0.1
C16:0	12.2±0.1	13.8±0.1	16.0±0.1	14.5±0.1	15.2±0.1	17.2±0.1	12.9±0.1	17.0±0.1	18.6±0.1
C18:0	2.3±0.1	4.7±0.2	10.1±0.2	3.2±0.2	7.4±0.1	12.1±0.1	3.4±0.1	11.4±0.3	15.1±0.1
C18:1	79.4±0.1	75.4±0.1	68.2±0.1	75.4±0.1	71.6±0.1	65.4±0.1	77.4±0.1	65.5±0.1	60.9±0.1
C18:2	5.6±0.1	5.8±0.1	5.3±0.1	6.4±0.1	5.4±0.1	5.1±0.2	5.9±0.1	5.6±0.1	5.0±0.1
∑SFA[4)]	15.0±0.1	18.8±0.1	26.5±0.1	18.1±0.1	23.1±0.1	29.5±0.1	16.7±0.1	28.9±0.2	34.0±0.1
∑USFA[5)]	85.0±0.1	81.2±0.1	73.5±0.1	81.9±0.1	76.9±0.1	70.5±0.1	83.3±0.1	71.1±0.1	66.0±0.1
PMF : StEE (1:3)[1)]									
Fatty acid	Lipozyme TLIM 2 wt%[2)]			Lipozyme TLIM 3 wt%			Lipozyme TLIM 4 wt%		
	Reaction time (hr)			Reaction time (hr)			Reaction time (hr)		
	1	5	9	1	5	9	1	5	9
C14:0	0.4±0.1	0.3±0.1	0.4±0.1	0.4±0.1	0.4±0.1[3)]	0.5±0.1	0.4±0.1	0.4±0.1	0.4±0.1
C16:0	12.1±0.1	13.3±0.1	15.7±0.1	12.9±0.1	15.9±0.1	16.8±0.1	12.9±0.1	15.7±0.1	17.9±0.1
C18:0	2.5±0.1	5.3±0.1	11.4±0.1	3.2±0.1	10.2±0.1	14.2±0.3	3.7±0.1	12.4±0.1	19.2±0.1
C18:1	78.5±0.1	75.0±0.1	66.9±0.1	77.1±0.1	67.7±0.1	63.5±0.1	76.8±0.1	66.3±0.1	57.4±0.1
C18:2	6.4±0.1	6.1±0.1	5.6±0.1	6.4±0.1	5.8±0.1	5.0±0.1	6.2±0.1	5.2±0.1	5.2±0.1
∑SFA[4)]	15.1±0.1	18.9±0.1	27.5±0.1	16.5±0.1	26.5±0.1	31.5±0.2	17.0±0.1	28.4±0.1	37.4±0.1
∑USFA[5)]	84.9±0.1	81.1±0.1	72.5±0.1	83.5±0.1	73.5±0.1	68.5±0.1	83.0±0.1	71.6±0.1	62.6±0.1

[1)]Molar ratio of palm mid fraction (PMF) with stearic ethyl ester (StEE).
[2)]Amount of Lipozyme TLIM (wt%) was obtained by the weight of substrate mixture.
[3)]All values are described as mean±SD (n=2).
[4)]Sum of saturated fatty acids. [5)]Sum of unsaturated fatty acids.

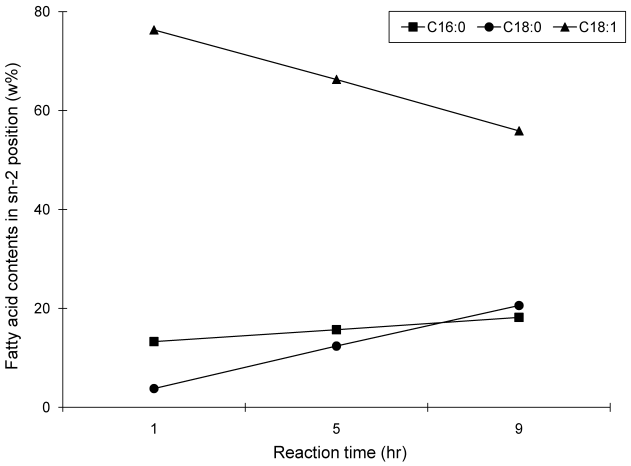

Fig. 1. The relationship between reaction time and the content of each fatty acid at the sn-2 position of the reaction product which was obtained under the reaction condition of molar ratio (PMF : stearic ethyl ester=1:3) and enzyme amount (Lipozyme TLIM 4 wt% based on the weight of substrate mixture).

의 sn-1,3 위치에 stearoyl기의 결합이 증가한 후에 acyl migration로 인하여 stearoyl기가 sn-2 위치로 이동하였기 때문에 C18:0이 반응물 sn-2 위치에 증가되어 나타난 것이다. 반면 본 실험에서 수행된 반응 조건 중에서 가장 큰 반응 기질의 몰 비율(1:3) 및 가장 많은 효소양(4 wt%) 일 때 9시간 반응 후에는 반응물의 sn-2 위치에 존재하는 C18:1의 함량이 57.4 area%로써 모든 반응 조건 가운데에서 최저 수치를 보였으며, 반응 전 PMF의 sn-2 위치에 함유된 81.8 area%와 비교했을 때에는 약 24.4 area%가 감소한 결과를 보였다. 특히, sn-2 위치에서의 C18:0과 C16:0의 함량의 증가는 몰 비율이나 효소양에 비해 반응 시간에 대하여 더 큰 변화를 보였다. 각각의 몰 비율(1:1, 1:1.5, 1:2, 1:3)에서 효소양이 4 wt%일 경우, 반응 전 PMF의 sn-2 위치에서 81.8 area%이었던 C18:1 함량은 5시간으로 반응시간이 증가함에 따라 65.5~69.1 area%로 낮아졌고, 이후 반응이 9시간까지 반응이 진행됨에 따라 57.4~62.2로 더욱 낮아졌다. 이는 반응시간이 증가됨에 따라 acyl migration도 증가하여 반응물의 sn-2 위치에서의 C18:1은 감소하면서 C16:0과 C18:0은 증가하여 sn-2 위치에서의 총 포화지방산이 차지하는 비율이 높아진 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 Mu 등(19)의 연구에서 효소를 이용한 재구성지질의 합성에 있어 반응시간이 단축될수록 acyl migration 생성이 감소하였다고 보고된 바 있다.

몰 비율, 시간과 효소양에 따른 triacylglycerol(TAG) 조성 변화

PMF와 stearic ethyl ester의 몰 비율을 1:1, 1:1.5, 1:2, 1:3으로 변화해 가면서 기질 질량의 2, 3, 4 wt%에 해당하는 Lipozyme TLIM을 이용하여 반응한 합성물의 TAG 조성을 reversed-phase HPLC로 분석하였다. 각각의 반응 시간(1, 5, 9 hr)에 따라 효소의 양과 기질의 몰 비율을 달리하여 반응한 결과를 Table 4~6에 나타내었다. 반응 기질로 사용된 PMF의 주요 TAG 조성은 POP로써 92.4 area%를 차지하였다. 반응이 진행됨에 따라 POP는 감소하면서 첨가된 stearic ethyl ester와 PMF의 반응으로 POS가 증가하는 경향을 보였으며, 더불어 SOS 비율도 증가함을 알 수 있었다. 반응 1시간이 경과했을 때 TAG 조성에 있어 가장 큰 변화는 효소양 4 wt%과 몰 비율 1:3일 때 나타났다(Table 4). POP는 51.9 area%로 반응 전과 비교하여 약 1.8배 감소하였고, POS의 경우 36.9 area%로 그 양이 약 5.7배 증가하였으며 SOS는 7.5 area% 생성되었다. 또한 효소양이 4 wt%일 때 1:1.5와 1:2 몰 비율 사이에서 POS는 최대 11.9 area%까지 증가함을 알 수 있었다. 이후 몰 비율이 같을 때의 5시간 반응을 살펴보면, 효소양이 증가함에 따라 반응물의 TAG 조성 변화에 있어서 전반적으로 뚜렷한 변화를 보였다(Table 5). 예를 들면, 몰 비율 1:2에서 POP는 효소양 2 wt%를 3 wt%로 증가시켰을 때 30.8 area% 감소하여 26 area%를 나타내었으나 POS의 경우 1:2 몰 비율에서 효소양 3 wt%일 때 53.5 area%

Table 4. Triacylglycerol (TAG) species of the 1-hr reaction product from palm mid fraction (PMF) : stearic ethyl ester (StEE) at the different substrate ratio (Unit: area%)

PN[1)]	TAG species[2)]	PMF	Lipozyme TLIM 2 wt%[3)]				Lipozyme TLIM 3 wt%				Lipozyme TLIM 4 wt%			
			1:1[4)]	1:1.5	1:2	1:3	1:1	1:1.5	1:2	1:3	1:1	1:1.5	1:2	1:3
46	PLP	1.2	1.8	0.8	1.6	1.1	1.2	–	1.1	1.0	1.7	0.8	–	0.5
48	POO	–	1.1	0.3	1.2	1.3	1.0	0.5	0.6	0.5	1.9	1.1	1.1	0.6
	POP/PPO	92.4	82.5	81.6	75.3	70.6	78.3	79.4	71.9	63.0	72.3	79.1	64.9	51.9
	PPP	–	0.9	0.4	0.9	0.6	0.9	0.4	0.6	0.6	1.2	–	0.7	0.5
50	SOO	–	0.2	0.1	0.3	–	–	–	0.1	0.2	0.5	1.1	–	0.5
	POS/PSO	6.44	12.3	15.4	18.0	22.7	16.5	17.9	22.5	28.8	19.4	16.2	28.1	36.9
	PPS	–	0.4	0.4	0.6	0.7	0.6	0.4	0.5	0.8	1.0	0.6	1.2	1.2
52	SOS/SSO	–	0.8	1.2	1.8	2.7	1.4	1.4	2.3	4.8	1.6	1.2	4.1	7.5
	PSS	–	–	–	0.2	0.4	–	–	0.3	0.3	0.3	–	–	0.4
54	SSS	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

[1)]PN (partition number)=total carbon number (CN)−2×total number of double bonds (ND).
[2)]TAG species contain fatty acids of L=linoleic acid, O=oleic acid, P=palmitic acid, S=stearic acid.
[3)]Amount of Lipozyme TLIM (wt%) was obtained by the weight of substrate mixture.
[4)]Molar ratio of palm mid fraction to stearic ethyl ester.

Table 5. Triacylglycerol (TAG) species of the 5-hr reaction product from palm mid fraction (PMF) : stearic ethyl ester (StEE) at the different substrate ratio (Unit: area%)

PN[1)]	TAG species[2)]	PMF	Lipozyme TLIM 2 wt%[3)]				Lipozyme TLIM 3 wt%				Lipozyme TLIM 4 wt%			
			1:1[4)]	1:1.5	1:2	1:3	1:1	1:1.5	1:2	1:3	1:1	1:1.5	1:2	1:3
46	PLP	1.2	0.5	1.1	–	–	–	–	–	–	0.9	–	–	–
48	POO	–	2.6	1.9	0.9	0.9	2.1	1.9	1.6	1.3	3.3	3.2	1.3	1.3
	POP/PPO	92.4	69.0	63.9	56.8	37.6	56.6	43.0	26.0	14.9	45.3	33.0	20.7	19.9
	PPP	–	1.4	1.6	0.4	0.8	1.9	1.3	0.9	0.5	1.9	1.8	1.0	0.5
50	SOO	–	–	–	–	0.8	1.1	1.0	1.1	1.7	1.1	1.6	1.6	1.4
	POS/PSO	6.44	24.2	27.9	37.0	45.3	33.4	41.1	53.5	51.3	38.1	44.9	55.4	50.2
	PPS	–	0.9	1.2	1.0	2.0	2.0	3.4	2.7	3.8	3.4	4.3	3.3	3.0
52	SOS/SSO	–	1.5	2.3	4.0	10.9	3.0	6.9	12.7	21.6	4.7	8.7	14.4	20.3
	PSS	–	–	–	–	1.7	–	1.5	1.6	4.0	1.3	2.7	2.3	2.9
54	SSS	–	–	–	–	–	–	–	–	0.9	–	–	–	0.5

[1)]PN (partition number)=total carbon number (CN)−2×total number of double bonds (ND).
[2)]TAG species contain fatty acids of L=linoleic acid, O=oleic acid, P=palmitic acid, S=stearic acid.
[3)]Amount of Lipozyme TLIM (wt%) was obtained by the weight of substrate mixture.
[4)]Molar ratio of palm mid fraction to stearic ethyl ester.

로 크게 증가하였다. 또한 POS는 몰 비율 1:2이고 효소양 4 wt%이며 5시간 반응조건에서 55.4 area%로 가장 높은 수치를 보였으며 PPS와 PSS 함량도 각각 3.3 area%, 2.3 area%를 나타내었다(Table 5, Fig. 2C). 한편, 몰 비율이 1:3으로 증가하여도 더 이상 POS는 증가하지 않고 오히려 일부 감소하는 경향을 보였으며 이와 같은 현상은 효소양이 4 wt%일 때도 나타났다. 이는 효소양이 증가할수록 반응은 가속화되지만 어느 일정 한계에 도달했을 때는 더 이상 대칭

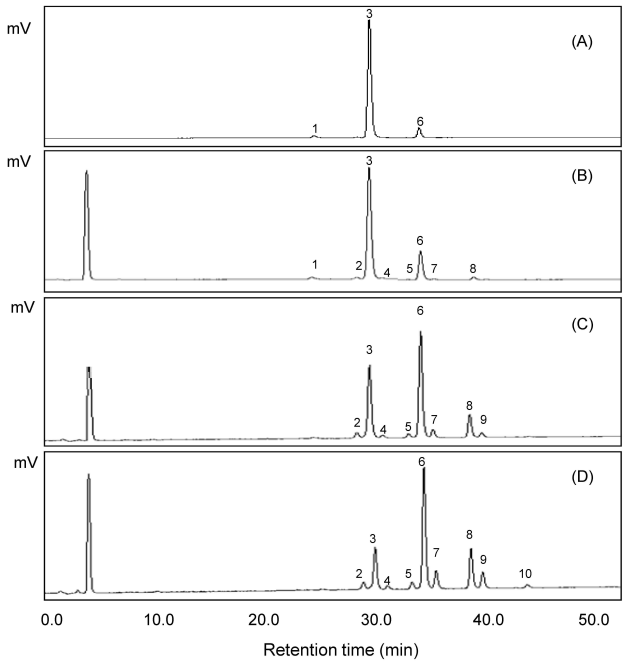

Fig. 2. Chromatograms from the reversed-phase high performance liquid chromatographic separation of palm mid fraction (A) and reaction product of palm mid fraction : stearic ethyl ester=1:2 (molar ratio), Lipozyme TLIM=3 wt%, and reaction time=1 hr (B), 5 hr (C), 9 hr (D). Peak number 1, PLP; 2, POO; 3, POP (PPO); 4, PPP; 5, SOO; 6, POS (PSO); 7, PPS; 8, SOS (SSO); 9, PSS; 10, SSS; TAG species contain fatty acids: L=linoleic acid, O=oleic acid, P=palmitic acid, S=stearic acid.

형 구도의 TAG 합성이 이루어지지 않았다. 또한 효소양과 몰 비율, 반응시간이 증가함에 따라 PN=52 이상의 포화지방산만으로 구성되어진 PPS, PSS와 SSS도 증가하여 새로운 형태의 TAG peak를 확인할 수 있었다. 이는 sn-1,3 위치에 특이적으로 작용하는 효소 반응에 의해 stearic ethyl ester가 PMF의 주 TAG 형태인 POP에 결합함으로써 POS와 SOS가 생성되었으며 이후 반응이 더욱 진행될수록 acyl migration에 의하여 PPS, PSS, SSS 등으로 변화되었을 것으로 예측된다. 몰 비율 1:3일 경우 효소양 4 wt%에서 반응 9시간 경과 후에는 POP는 전체 반응 중 5.3 area%로 가장 낮은 수치를 나타낸 반면, SOS는 31.4 area%로 이 실험에서 수행된 다른 반응조건들 중에서 가장 높은 수치를 보였다.

반응 조건에 따른 acyl migration과 POS 함량

위에서 각 TAG 분자의 양(%)은 RP-HPLC에서 얻어진 해당 peak의 area%로 나타냈는데, 각 peak는 대칭형 TAG 뿐만 아니라 그와 PN이 같은 비대칭형 TAG를 포함할 수 있다. 즉, POP와 PPO, SOS와 SSO, 그리고 POS와 이에 해당하는 비대칭형 TAG들이 서로 같은 PN을 가지므로 동일 peak에 나타날 수 있는 것이다. 이들의 존재정도는 sn-2 위치의 지방산 분석으로 알 수 있는데, 반응이 진행되면서 acyl migration에 의하여 비대칭형 TAG들이 생성되기 때문에 반응물의 sn-2 위치에 존재하는 포화지방산(C16:0+C18:0)의 함량으로 acyl migration의 정도를 알 수 있는 것이다. 이에 따라 반응기질의 몰 비율과 반응시간 그리고 효소양에 따른 acyl migration과 POS 함량 변화를 비교하였다(Fig. 3). Acyl migration은 반응에 사용되는 반응기질의 몰 비율, 반응시간 그리고 효소양이 증가함에 따라 점차 증가하였고, 특히 반응 시간이 늘어남에 따라 가장 뚜렷한 증가율을 보였다. 한편 POS 합성양의 경우 반응 초기에는 몰 비율, 반응시간, 효소양의 증가와 함께 꾸준히 증가하는 경향을 보였으나 일정 한계에 도달했을 때 더 이상 증가하지 않고, 오히려 감소하는 결과를 보였다. 또한 POS 이외에 PPS, PSS, SSS

Table 6. Triacylglycerol (TAG) species of the 9-hr reaction product from palm mid fraction (PMF) : stearic ethyl ester (StEE) at the different substrate ratio (Unit: area%)

PN[1)]	TAG species[2)]	PMF	Lipozyme TLIM 2 wt%[3)]				Lipozyme TLIM 3 wt%				Lipozyme TLIM 4 wt%			
			1:1[4)]	1:1.5	1:2	1:3	1:1	1:1.5	1:2	1:3	1:1	1:1.5	1:2	1:3
46	PLP	1.2	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
48	POO	–	3.4	1.7	2.5	1.7	2.9	3.8	1.3	0.6	4.2	3.6	3.0	0.9
	POP/PPO	92.4	49.8	28.3	25.8	13.3	30.2	27.0	12.0	8.6	26.4	18.5	12.4	5.3
	PPP	–	1.6	1.5	1.5	0.7	2.0	1.6	0.8	0.5	2.7	1.7	1.6	–
50	SOO	–	1.3	1.1	1.2	2.4	1.4	2.9	2.1	2.3	1.9	3.3	3.6	2.8
	POS/PSO	6.44	37.4	47.7	49.2	47.8	47.5	47.2	51.0	45.3	44.1	46.8	40.9	41.1
	PPS	–	3.9	6.0	5.1	4.3	5.6	5.2	5.2	5.6	9.6	7.8	8.6	5.8
52	SOS/SSO	–	2.6	10.9	11.6	23.4	7.7	10.0	21.5	27.4	7.3	12.0	17.9	31.4
	PSS	–	–	2.8	3.1	5.3	2.8	2.4	5.2	8.7	3.8	5.5	9.7	10.4
54	SSS	–	–	–	–	1.1	–	–	1.0	1.1	–	0.9	2.3	2.4

[1)]PN (partition number)=total carbon number (CN)−2×total number of double bonds (ND).
[2)]TAG species contain fatty acids of L=linoleic acid, O=oleic acid, P=palmitic acid, S=stearic acid.
[3)]Amount of Lipozyme TLIM (wt%) was obtained by the weight of substrate mixture.
[4)]Molar ratio of palm mid fraction to stearic ethyl ester.

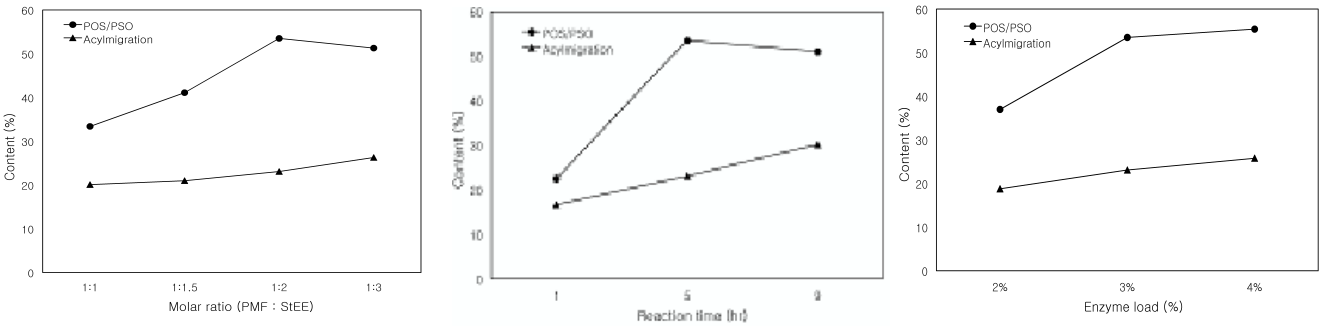

Fig. 3. The relationship between the content of 1(3)-palmitoyl-2-oleoyl-3(1)-stearoyl glycerol (POS) and degree of acyl migration in the reaction product.

의 생성도 확인할 수 있었는데 이는 전술한 바와 같이 acyl migration 현상과 관련이 있다. 즉, 점차 반응이 진행되면서 POP에서 PPO로, 그리고 POS에서 PSO와 같이 sn-2 위치에 palmitic acid와 stearic acid가 전이된 TAG가 생성된 후, PPO와 PSO는 다시 esterification에 의하여 PPP, PPS, PSS 등 포화지방산만으로 구성되어진 TAG 분자로 변화된 것으로 보인다. 이러한 점을 고려하였을 때 본 연구에서 목적으로 하는 POS의 합성에는 몰 비율 1:2, 효소양 3 wt%, 5시간 반응 시 가장 높은 POS 함량을 나타냈으며 acyl migration에 의한 반응물 sn-2 위치의 포화지방산 함량은 23.1%로써 반응 전의 PMF 대비 약 2배 증가한 것을 알 수 있었다.

요 약

본 연구에서는 palm mid fraction(PMF)와 stearic ethyl ester를 기질로 Lipozyme TLIM을 이용한 에스테르 교환반응을 실시하였으며 기질의 몰 비율과 효소양 및 시간에 따른 TAG 조성 변화와 함께 POS 구성율 및 acyl migration 정도를 알아보았다. sn-2 위치에서의 주요 지방산 조성 변화는 몰 비율과 효소양, 반응시간이 증가할수록 C18:1은 점차 감소하였고, C16:0과 C18:0은 증가함을 알 수 있었다. 이와 같은 변화는 특히 반응시간이 증가함에 따라 두드러지게 나타났으며 acyl migration 생성과 관계가 깊은 것으로 예측되었다. 그 결과 총 포화지방산의 함량은 최고 37.4 area%까지 증가한 수치를 보였다. 반응 합성물의 주요 TAG 조성으로는 POP, POS, SOS와 같은 대칭형 구조의 TAG가 확인되었으며 반응이 진행됨에 따라 POP는 감소하고 POS가 증가하는 경향을 보였다. Acyl migration과 POS 함량을 고려하였을 때 몰 비율 1:2, 효소양 3 wt%, 5시간 반응 조건에서 POS는 53.5 area%의 높은 함량을 보였으며 이때 총 포화지방산 함량은 반응 전 11.9 area%와 비교하여 약 2배 증가한 23.1 area%를 나타내었다. 한편, 전체 반응 조건 중 가장 높은 POS 함량은 55.4 area%의 수치를 보였는데, 이후 몰 비율과 효소양의 증가와 더불어 반응시간이 지속되었음에도 불구하고 POS는 오히려 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 반응이 진행되면서 acyl migration에 의해 sn-2 위치에 palmitic acid와 stearic acid가 전이된 PPS, PSS, SSS와 같은 TAG의 생성도 증가함을 알 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 2011년도 농림수산식품부 농림기술개발사업의

지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Lipp M, Simoneau C, Ulberth F, Anklam E, Crews C, Prereton P, Greyt W, Schwack W, Wiedmaier C. 2001. Composition of genuine cocoa butter and cocoa butter equivalents. *J Food Compos Anal* 14: 399-408.
2. Segall SD, Artz WE. 2005. Analysis of triacylglycerol isomers in Malaysian cocoa butter using HPLC-mass spectrometry. *Food Res Int* 38: 167-174.
3. Ciftci ON, Fadiloglu S. 2009. Conversion of olive pomace oil to cocoa butter-like fat in a packed-bed enzyme reactor. *Biores Technol* 100: 324-329.
4. Mojovic L, Siler-Marinkovic S, Kukic G, Vunjak-Novakovic G. 1993. *Rhizopus arrhizus* lipase-catalyzed interesterification of the midfraction of palm oil to a cocoa butter equivalent fat. *Enzyme Microb Technol* 15: 438-443.
5. Shukla VKS. 1995. Cocoa butter properties and quality. *Lipid Technol* 7: 54-57.
6. Shin JA, Akoh CC, Lee KT. 2009. Production and physicochemical properties of functional-butterfat through enzymatic interesterification in a continuous reactor *J Agric Food Chem* 57: 888-900.
7. Park RK, Lee KT. 2004. Synthesis and characterization of mono and diacylglycerol enriched functional oil by enzymatic glycerolysis of corn oil. *Korean J Food Sci Technol* 36: 211-216.
8. Chang PS, Ha JU, Lee JH, Kim SW, Park KM. 2009. Optimization of interesterification reaction for the continuous production of *trans*-free fat in a packed bed enzyme bioreactor with immobilized lipase. *Korean J Food Sci Technol* 41: 173-178.
9. Khumalo LW, Majoko L, Read JS, Ncube I. 2002. Characterization of some under utilized vegetable oils and their evaluation as starting materials for lipase catalyzed production of cocoa butter equivalents. *Ind Crop Prod* 16: 237-244.
10. Xu X. 2000. Enzymatic production of structured lipids: Process reactions and acyl migration. *INFORM* 11: 1121-1131.
11. Willis WM, Lencki RW, Marangoni AG. 1998. Lipid modification strategies in the production of nutritionally functional fats and oils. *Food Sci Nutr* 38: 639-674.
12. Berger K. 1986. Palm oil products: Why and how to use them. *Food Technol* 9: 74-79.
13. Müller H, Jordal O, Kierulf P, Kirkhus B, Pedersen JI. 1998. Replacement of partially hydrogenated soybean oil by palm oil in margarine without unfavorable effects on serum lipoproteins. *Lipids* 33: 879-887.
14. Gunstone FD. 2001. Cocoa butter and cocoa butter equivalents. *Structured and Modified Lipids* 14: 401-422.
15. Traitler H, Dieffenbacher A. 1985. Palm oil and palm kernel oil in food products. *J Am Oil Chem Soc* 62: 417-421.
16. Samsudin S, Rahim M. 1996. Use of palm mid-fraction in white chocolate formulation. *J Sci Food Agric* 71: 483-490.
17. Fomuso LB, Akoh CC. 2002. Lipase-catalyzed acidolysis of olive oil and caprylic acid in a bench-scale packed bed bioreactor. *Food Res Int* 35: 15-21.
18. Lee KT, Foglia TA. 2001. Fractionation of menhaden oil and partially hydrogenated menhaden oil; characterization of triacylglycerol fractions. *J Am Oil Chem Soc* 78: 297-303.
19. Mu H, Xu X, Hoy CE. 1998. Production of specific-structured triacylglycerols lipase-catalyzed interesterification in a laboratory scale continuous reactor. *J Am Oil Chem Soc* 75: 1187-1193.

(2011년 5월 20일 접수; 2011년 7월 1일 채택)