J Korean Soc Food Sci Nutr
40(10), 1430~1437(2011)

한국식품영양과학회지
http://dx.doi.org/10.3746/jkfn.2011.40.10.1430

Canola Oil로부터 코코아버터와 유사한 Triacylglycerol 조성을 가진 재구성지질의 효소적 합성 최적화 연구

문준희 · 이정희 · 신정아 · 홍순택 · 이기택†
충남대학교 식품공학과

Optimization of Lipase-Catalyzed Production of Structured Lipids from Canola Oil Containing Similar Composition of Triacylglycerols to Cocoa Butter

Jun-Hee Moon, Jeung-Hee Lee, Jung-Ah Shin, Soon-Taek Hong, and Ki-Teak Lee†

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

Abstract

Synthesis conditions of cocoa butter equivalents were optimized using the response surface method (RSM) by interesterification of canola oil (Ca), palmitic ethyl ester (PEE), and stearic ethyl ester (StEE). The reaction was catalyzed by immobilized lipase (Lipozyme TLIM) from *Thermomyces lanuginosa* to produce structured lipids containing a composition of triacylglycerols similar to cocoa butter. Reaction conditions were optimized using D-optimal design with the three reaction factors of the substrate molar ratio of canola oil to palmitic ethyl ester and stearic ethyl ester (Ca : PEE : StEE=1:1:3, 1:1.66:5, 1:2:6, 1:2.33:7, 1:3:9, X_1), enzyme ratio (2~6%, X_2), and reaction time (30~270 min, X_3). The optimal conditions that minimized acyl-migration while maximizing 1-palmitoyl-2-oleoyl-3-stearoyl glycerol (POS), 1,3-distearoyl-2-oleoyl glycerol (SOS), and 1,3-dipalmitoyl-2-oleoyl glycerol (POP) were predicted, resulting in Ca : PEE : StEE=1:3:9, 6% of enzyme ratio, and 40 min of reaction time. The reaction product of structured lipids was synthesized again under the same conditions, showing 10.43 area% of acyl-migration, 25.31 area% of POS/PSO, 19.79 area% of SOS, and 11.22 area% of POP.

Key words: cocoa butter equivalent, canola oil, cocoa butter, acyl-migration

서 론

코코아버터(cocoa butter)는 카카오(*Theobroma cacao*)의 과실 속의 종자(카카오 콩)에서 얻어지는 유지로써, 초콜릿 및 관련 제과 공업에 중요한 원료인데 그 이유 중의 하나는 코코아버터가 특유의 triacylglycerol(TAG)의 조성으로부터 오는 바람직한 특성을 가지고 있기 때문이다. 코코아버터의 주요 TAG 조성은 포화(saturated)-불포화(unsaturated)-포화(saturated) 지방산으로 구성되어 있는데, oleic acid가 sn-2 위치에 있고 palmitic acid와 stearic acid가 sn-1,3 위치에 결합되어 있는 대칭구조(1-palmitoyl-2-oleoyl-3-stearoyl glycerol, POS)가 34~39%, oleic acid가 sn-2 위치에 있고 stearic acid가 sn-1,3 위치에 있는 형태(1,3-distearoyl-2-oleoyl glycerol, SOS)가 23~30%, oleic acid가 sn-2 위치이며 palmitic acid가 sn-1,3 위치에 결합되어 있는 대칭구조(1,3-dipalmitoyl-2-oleoyl glycerol, POP)가 14~17%로 알려져 있다. 카카오 재배지역에 따라 차이를 보이기도 하는 이와 같은 TAG 조성은 유지가 상온에서는 딱딱함과 부러지기 쉬운 성질을 가지며 사람의 입안에서는 완전히 녹아버리는 예민한 융점을 가지게 하는 주요한 원인이다(1,2). 또한 코코아버터는 초콜릿 및 관련 제과 공업의 원료에서 가장 비싼 원료 중의 하나이므로 경제적인 측면과 불안정한 원료의 공급을 대체하기 위하여 다양한 코코아버터 대체유지들이 개발되고 있는 실정이다(3).

재구성지질(structured lipid, SL)이란 유지의 물리적 또는 화학적 특성을 변화시키거나 공업적, 영양학적 특성을 개선하기 위하여 TAG의 지방산 조성 또는 지방산의 위치(regiospecific position)가 글리세롤 분자 안에서 화학적 또는 효소적 방법에 의해 재합성된 지질을 말한다(4,5). 화학적 합성의 경우에는 에너지의 소비가 크고 부반응이 생겨 유해물질의 잔존량이 문제가 되는 단점이 있으나, 효소 반응은 효소의 기질 및 반응 특이성을 이용하여 반응을 선택적, 효율적으로 할 수 있으며 고정화 효소를 사용할 경우 재사용이 가능하므로 경제적인 장점이 있다(6). 최근 효소 촉매로써 *Thermomyces lanuginosa*로부터 유래한 lipase를 silica gel에 고정화시킨 Lipozyme TLIM가 널리 이용되고 있다. Lipozyme TLIM은 TAG 분자의 sn-1,3 위치에 선택적으로 작용하는 성질을 가지며, TAG의 ester 결합을 가수분해하

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

여 글리세롤과 지방산으로 분해한 후 다시 esterification 하는 작용을 가진다(7,8). 하지만 이러한 효소적 반응은 여러 가지 반응요인들에 의하여 acyl-migration 현상을 일으키기도 한다. Acyl-migration이란 TAG 구조에서 sn(stereo number)-1(3) 위치의 acyl기들이 sn-2 위치로 이동하거나, sn-2 위치의 acyl기가 sn-1(3) 위치로 이동하는 것을 말하며, 이로 인해 의도하지 않은 TAG 분자들이 생성될 수도 있다. 이 현상은 주로 반응 온도가 높아질수록 일어나며, 그 외에 반응시간이나 사용되는 효소량이 높아질수록 증가한다고 알려져 있다(9). 고체지를 이용하는 효소적 합성 반응 시에는 기질이 녹는 최소한의 온도가 필요하므로 acyl-migration 현상을 완전히 제어하는 것은 어려우며, 이에 따라 합성 과정 중의 반응 요소들을 조절하여 이를 최소화 하려는 연구가 진행되었다(10). 한편, 카놀라유(canola oil)는 유채꽃에서 추출한 기름으로써 재래종에서 추출한 카놀라유는 독성물질인 에루스산(erucic acid)이 함유되어 식용으로 널리 사용하지 못하였지만, 이후 품종개량이 되어 이런 단점들이 보완되었다(11).

본 연구에서는 코코아버터와 유사한 TAG 조성(즉, POS, SOS, POP와 같이 포화-불포화-포화지방산으로 구성 되어진 대칭형 TAG)을 가진 재구성지질을 합성하기 위하여 sn-2 위치에 oleic acid의 함량이 높은 카놀라유와 palmitic ethyl ester(PEE) 및 stearic ethyl ester(StEE)를 기질로 사용하고 sn-1,3 위치 선택성을 가진 Lipozyme TLIM를 촉매로 이용하여 세 가지 반응 요인들(기질비율, 반응효소양, 반응시간)에 따른 합성 반응조건을 반응 표면 분석법으로 최적화하였다. 이때 종속변수로써 코코아버터의 대표 TAG 형태이면서 대칭형 TAG 분자들인 POS, SOS, POP의 합성량을 살펴보았다. 한편, 효소 반응 중에 대칭형 TAG 이외에 비대칭형인 PSO, SSO, PPO등이 생성될 수 있는데, 이들의 생성 정도를 알아보기 위하여 acyl-migration(TAG의 sn-2 위치에 존재하는 palmitic acid+stearic acid %)도 함께 종속변수로 고려하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 카놀라유(canola oil, Ca)는 Hunt-Wesson(ConAgra Foods, Inc., Omaha, NE, USA) 제품을 이용하였으며, 90% 이상의 순도를 가진 palmitic ethyl ester (PEE)와 stearic ethyl ester(StEE)는 (주)네오메가(Daejeon, Korea)에서 제공 받은 것을 사용하였다. 실험 전 카놀라유의 산가와 과산화물가는 각각 0.06과 0.1이었으며, PEE의 산가와 과산화물가는 0.35와 0.1, StEE의 산가와 과산화물가는 0.09와 0이었다. 코코아버터는 C사(Seoul, Korea)에서 제공받았다. Interesterification을 통해 재구성지질의 합성에 사용된 Lipase TLIM은 Novozymes(Bagsvaerd, Denmark)사로부터 구입한 것을 사용하였으며, 재구성지질의 sn-2 위치의 지방산을 분석하기 위해 사용된 pancreatic lipase(Type II, crude)는 Sigma-Aldrich Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. Fatty acid methyl ester 표준물질은 Nu-Check Prep, Inc.(Elysian, MN, USA)에서 구입한 것을 사용하였으며, 모든 기기분석에 사용된 용매는 HPLC grade를 이용하였다.

반응표면분석을 통한 코코아버터 유사 재구성지질 합성 최적화 연구

D-optimal 계획을 이용한 반응표면분석을 수행하기 위하여 예비조건을 선정하고 이에 따라 합성된 재구성지질의 TAG 조성 및 sn-2 위치의 지방산 조성을 분석한 결과, 특히 1:3:9 (Ca : PEE : StEE)의 비율에서 코코아버터와 유사한 TAG (%) 조성(i.e. POS>SOS>>POP)을 나타내었다. 이는 StEE의 비율을 PEE보다 3배 정도 높이면 카놀라유의 triolein에 StEE가 더 많이 결합하기 때문에 POS와 SOS의 합성양이 POP보다 증가하기 때문이다. 이 결과를 바탕으로 본 실험에서는 독립변수(X_n)로 기질의 비율(Ca : PEE : StEE=1:1:3, 1:1.66:5, 1:2:6, 1:2.33:7, 1:3:9, X_1), 반응효소양(2~6%, X_2)을 각각 5단계로 부호화 하였으며, 반응시간(30~270 min, X_3)은 4단계로 설정하였다. 또한 종속(반응)변수로(Y_n) acyl-migration(Y_1, sn-2 위치의 palmitic acid+stearic acid %), POS%(Y_2), SOS%(Y_3), POP%(Y_4)로 하여 19개의 설정된 실험 조건에서 반응을 수행하였다. 각 대칭형 POS, SOS, POP의 area(%)은 RP-HPLC에서 얻어진 해당 peak의 area %로 나타내었는데 각 peak는 대칭형 TAG 뿐만 아니라 비대칭형 TAG인 PSO/OPS/OSP, SSO, PPO 등도 포함할 수 있고 이는 대부분 acyl migration 때문이다. 이들 비대칭형 TAG의 양은 sn-2 위치의 palmitic acid과 stearic acid의 양으로 유추할 수 있기 때문에 이를 Y_1 종속(반응)변수로 이용하였으며, 모든 RSM 결과는 Modde version 5.0 software (Umetrics, Umea, Sweden)을 이용하여 분석하였다. 각 조건에 따른 재구성지질의 합성을 위하여, 기질들을 각각의 기질 비율에 맞추어 뚜껑이 있는 삼각플라스크에 넣고, 정해진 비율의 Lipozyme TLIM을 혼합하여 shaking water bath(Vision scientific Co., Buchun, Korea)에서 220 rpm과 46°C의 조건으로 반응시간별로 시료를 채취하여 PTEF syringe filter(25 mm, 0.5 μm)로 여과하여 냉동 보관하였다.

지방산 조성 분석

TAG 구성 지방산의 조성을 분석하기 위하여 시료 100 μL를 취해서 0.5 mL의 hexane에 희석하여 thin-layer chromatography(TLC) silica plate(20×20 cm, Merck KGaA, Darmstadt, Germany)에 용매혼합물(petroleum ether : diethyl ester : acetic acid=90:10:1, v:v:v)로 전개하였다. 전개된 TLC plate에서 TAG 부분을 취하여 1.5 mL의 0.5 N 메탄올성 수산화나트륨 용액을 넣고 1분간 vortex하여 100

°C의 항온수조에서 5분간 중탕시킨 후 30~40°C로 냉각하였다. 여기에 10% BF_3 메탄올 용액을 넣고 다시 100°C의 항온수조에서 2분간 중탕시킨 후에 30~40°C로 냉각하였고, 2 mL의 iso-octane과 1 mL의 포화 NaCl 용액을 넣고 vortex 한 후 원심분리기(2000 rpm, 5 min)를 사용하여 두 층으로 나눈 다음, 상층액을 취하여 sodium sulfate column을 통과시켜 미량의 수분과 불순물을 제거하였다. 이와 같은 전처리 과정을 통하여 얻어진 methyl ester 형태의 지방산을 gas chromatograph(GC)에 주입하여 지방산 조성을 분석하였다. GC(Hewlett-Packard 6890 series, Avondale, PA, USA)의 분석 조건으로 column은 SP™-2560(100 m×0.25 mm×0.2 μm, Bellofonte, PA, USA)을 사용하였고, injector의 온도는 250°C로 하였으며, column의 온도는 150°C에서 5분간 등온한 후 4°C/min으로 220°C까지 올려서 30분간 등온하였다. Detector는 flame ionized detector(FID)를 사용하였고, 온도는 260°C로 하였다. Carrier gas는 N_2를 1 mL/min으로 하였다. 이러한 분석조건으로 시료 1 μL를 GC에 주입하여 분석하였다.

지방산의 위치별 조성 분석

TAG 분자내의 지방산 위치(sn-2, sn-1,3)별 조성을 알아보기 위하여 pancreatic lipase를 이용하여 가수분해를 실시하였다. 시료를 시험관에 각각 7 mg씩 취한 후 7 mL의 1 M Tris-HCl buffer(pH 7.6)와 0.05% 담즙산염 용액을 1.75 mL, 2.2% $CaCl_2$ 용액을 0.7 mL, pancreatic lipase 7 mg을 첨가하였다. 혼합물을 1분간 vortex 한 후, 37°C에서 3분 가온 후 다시 30초 진탕을 2~3회 반복한 다음 4 mL의 diethyl ether를 첨가하여 상징액을 취한 후 sodium sulfate column으로 수분 및 불순물을 제거하였다. 이를 부피비 전개용매(hexane : diethyl ether : acetic acid=50:50:1)를 이용하여 TLC silica plate에 전개하였다. 전개가 완료된 TLC silica plate로부터 R_f 값이 0.03인 2-monoacylglycerol(MAG) 부위만을 취하여 10% BF_3 메탄올 용액을 이용해 methylation 한 후 GC에 의하여 지방산 조성 분석을 실시하였다. 또한 sn-2 위치의 지방산에서 sn-1,3 위치의 지방산 조성 계산식은 Xu 등의 다음 계산식을 사용하였다(12).

sn-1,3 (area%)=[(3×fatty acid composition of total TAG)−fatty acid composition of sn-2]/2

Reversed-phase HPLC를 이용한 TAG 조성 분석

TAG 분자들의 조성을 알아보기 위하여 reversed-phase high pressure liquid chromatograph(RP-HPLC, Younglin, Anyang, Korea)를 이용하였다. 분석에 사용된 HPLC는 영린 SP930D 듀얼 펌프와 sedex 75 evaporative light scattering detector(ELSD, Seder, Alfortvill, France)가 장착되어 있었다. 이동상은 기울기용리로써 용매 A(acetonitrile)와 용매 B(iso-propanol : hexane=2:1, v/v)를 유속 1 mL/min으로 흘려주었다. 칼럼은 Nova-Pak® C18 column(4 μm, 150×3.9 mm I.d., Waters, Milford, MA, USA)이었다. 시료를 20 mg씩 취한 후 10 mL의 chloroform에 녹여서 PTFE syringe filter(0.5 μm, Advantec, Tokyo, Japan)를 이용하여 여과 후, 분석이 시작되면 용매 A와 B를 부피비 80:20 비율로 흘리기 시작하여 45분까지 54:46으로 변화시킨 뒤 15분간 유지하였다. 그 후 용매 A와 용매 B의 부피비를 54:46에서 65분까지 80:20으로 변화시킨 뒤 70분까지 유지함으로써 분석을 마쳤다. TAG의 조성은 retention time(RT)와 partition number (PN) 사이의 다음 관계식을 통하여 분석하였다(13).

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

결과 및 고찰

지방산 조성 및 TAG 조성

카놀라유(Ca)의 주요 지방산은 oleic acid(C18:1)가 64.35 area%로 가장 높은 비율을 나타냈으며, palmitic acid(C16:0)와 stearic acid(C18:0)는 각각 4.43와 2.01 area%로 pal-

Table 1. Fatty acid compositions and triacylglycerol (TAG) compositions of canola oil and cocoa butter

Fatty acid (area%)	Canola oil			Cocoa butter			Structured lipid[1)]		
	Total	sn-2	sn-1,3	Total	sn-2	sn-1,3	Total	sn-2	sn-1,3
16:0	4.43±0.08	0.79±0.07	6.26±0.15	25.38±0.03	1.54±0.08	37.30±0.01	13.01±0.35	4.85±0.94	17.01±0.42
18:0	2.01±0.05	0.30±0.03	2.86±0.06	37.83±0.01	2.13±0.11	55.68±0.07	36.27±1.64	5.58±0.28	49.26±0.06
18:1	64.35±0.84	56.98±0.09	68.03±1.22	33.03±0.04	88.68±0.40	5.20±0.15	35.99±1.78	65.54±1.82	20.72±1.75
18:2	20.97±0.46	30.86±0.07	16.02±0.73	2.70±0.01	7.27±0.20	0.41±0.08	11.43±0.21	19.81±0.35	7.06±0.44
18:3(n3)	8.24±0.25	11.06±0.21	6.83±0.28	1.07±0.00	0.37±0.02	1.41±0.00	3.30±0.13	4.22±0.26	2.75±0.25
Total USFA[2)]	93.56	98.91	90.88	36.79	96.33	6.12	50.72	89.57	30.53
Total SFA[3)]	6.44	1.09	9.12	63.21	3.67	93.88	49.28	10.43	66.27

TAG (area%)	LOO	LOP	OOO	POO	POP	SOO	POO	POP	SOO	POS/PSO	SOS	SSS	LOP	POO	POP	SOO	POS/PSO	SOS
	26.51	3.07	42.00	4.45	0.14	1.47	0.46	13.38	0.83	50.79	33.10	0.55	6.06	14.56	11.22	12.83	25.31	19.79

[1)]Structured lipid was obtained from the reaction condition; molar ratio of substrates (canola oil : palmitic ethyl ester : stearic ethyl ester)=1:3:9, enzyme amount=6% Lipozyme TLIM, and reaction time=40 min.
[2)]Total unsaturated fatty acids (%).
[3)]Total saturated fatty acids (%).

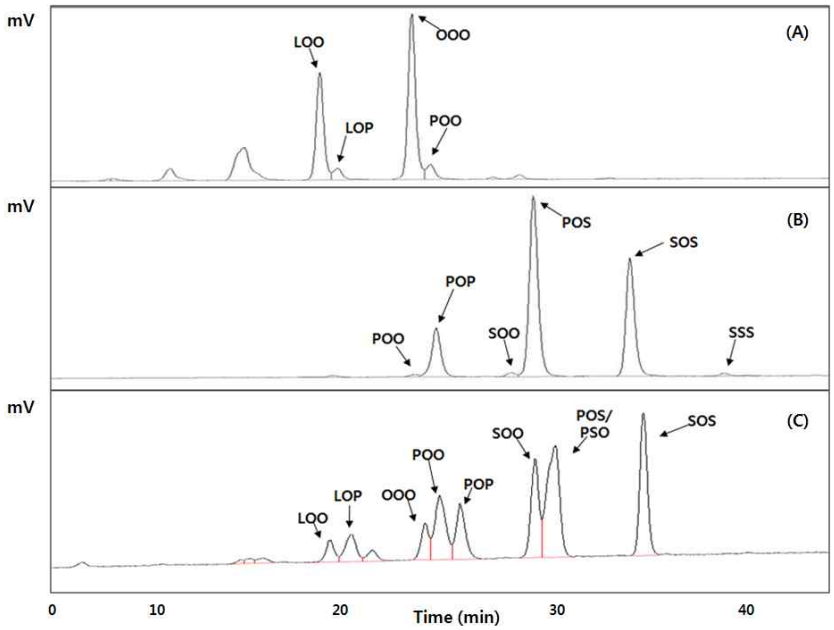

Fig. 1. RP-HPLC chromatograms of canola oil (A), cocoa butter (B) and structured lipid (C) obtained from the condition; molar ratio of substrate=(canola oil : palmitic ethyl ester : stearic ethyl ester)=1:3:9, enzyme amount=6% Lipozyme TLIM, reaction time=40 min.

mitic acid가 약 3배의 높은 함량을 나타내었다(Table 1). 또한 HPLC를 이용하여 TAG 조성을 분석한 결과 Fig. 1과 Table 1에서 나타내어진 바와 같이 지방산에서 가장 높은 비율을 나타낸 oleic acid로 이루어진 triolein이 42 area%의 높은 비율을 나타냈으며, 다음으로 1-linoleoyl-2,3-dioleoyl glycerol, LOO)이 26.51 area%이었다. 코코아버터의 지방산 조성은 stearic acid의 함량이 37.83 area%로 가장 높았으며, 다음으로 33.03 area%의 oleic acid와 25.38 area%의 palmitic acid이었다. 코코아버터의 sn-2 위치 지방산 조성은 oleic acid가 88.68 area%로 가장 높았으며 sn-1,3 위치의 지방산은 stearic acid 55.68 area%로 가장 높았으며 다음으로 palmitic acid 37.30 area%로 높은 비율을 나타내었다. 코코아 버터의 TAG 조성은 POS가 50.79 area%, SOS가 33.10%, POP가 13.38%로 나타났다(Fig. 1, Table 1).

한편, Fig. 2는 1:3:9(Ca : PEE : StEE) 반응기질 비율에서 수행된 예비실험에 의하여 합성된 재구성지질의 TAG 조성이 코코아버터의 TAG 조성과 유사한 경향을 보이는 POS> SOS>>POP의 순으로 합성되는 것을 보여주고 있다. 그 이유는 StEE의 비율을 PEE보다 약 3배가량 높이면 Ca에 주된 TAG 성분인 triolein에 StEE가 결합할 기회가 더 높아져서

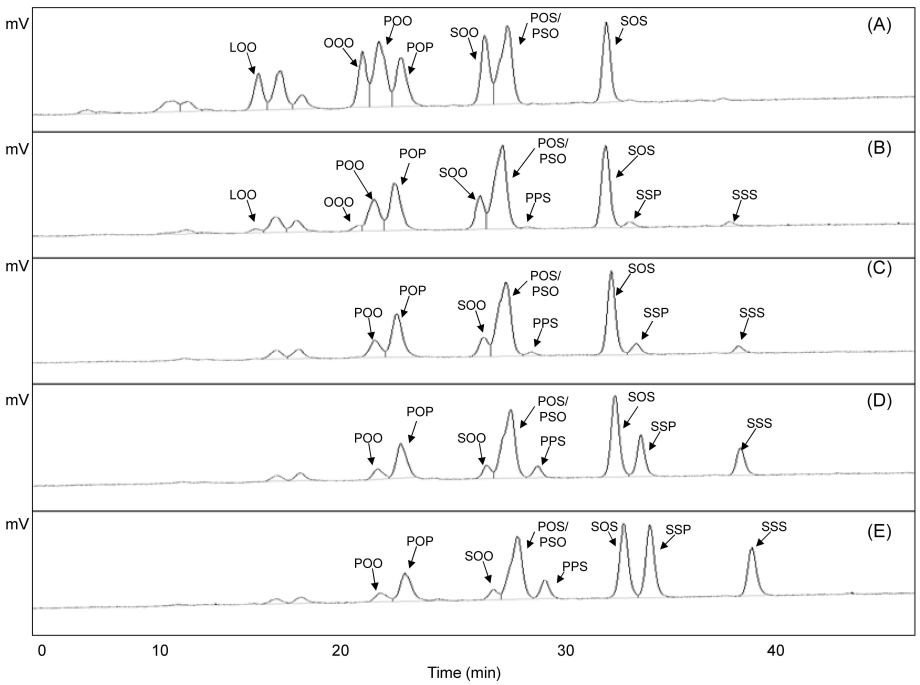

Fig. 2. RP-HPLC chromatograms of structured lipids. Reaction condition: molar ratio of substrates=canola oil : palmitic ethyl ester : stearic ethyl ester =1:3:9, enzyme amount=5% Lipozyme TLIM, reaction time=1 hr (A), 2 hr (B), 3 hr (C), 6 hr (D), 9 hr (E). P=palmitic, O=oleic, S=stearic, L=linoleic acid.

POS와 SOS의 생성이 POP보다 증가한 것으로 추측된다. 이에 따라 PEE보다 StEE의 비율이 높아야 대칭형(포화-불포화-포화)인 TAG 중에서도 POS와 SOS의 생성을 높일 수 있었으나, 반응시간이 길어질수록 포화-포화-포화지방산들로 구성되어진 다른 TAG(ex, PSS, SSS 등)의 합성도 증가되는 것을 볼 수 있었다.

D-optimal 계획을 이용한 반응표면분석

Ca의 sn-2 위치에 있는 oleic acid를 유지시키면서 sn-1,3 위치에 palmitic acid와 stearic acid의 함량이 높은 코코아버터 대체 재구성지질의 합성 최적화 반응조건을 찾기 위하여 D-optimal 계획에 따라 실험을 하였다. 독립변수는 기질의 비율(Ca : PEE : StEE=1:1:3, 1:1.66:5, 1:2:6, 1:2.33:7, 1:3:9, X_1), 반응효소양(2, 3.33, 4, 4.66, 6%, X_2), 반응시간(30, 90, 180, 270 min, X_3)으로 설정하였다.

각각 19개의 설정된 실험을 진행한 결과 종속(반응)변수 acyl-migration(Y_1, 즉 sn-2 위치의 palmitic acid+stearic acid %), POS%(Y_2), SOS%(Y_3), POP%(Y_4)의 결과는 Table 2에 제시하였다. 반응표면분석법에서 ANOVA의 lack of fit이 0.05 이상인 경우에 모형이 적합한 것이며, R^2값은 1에 가까운 수치일수록 좋은 모형임을 나타낸다. 본 D-optimal 계획에 따른 실험에서 Y_1에 관한 lack of fit은 0.176, R^2값은 0.972이었으며, Y_2에 관해선 lack of fit이 0.055, R^2의 값이 0.953, Y_3의 lack of fit은 0.128, R^2의 값은 0.968이었으며, Y_4에 대해서는 lack of fit이 0.051, R^2의 값이 0.932로 모두 적합한 모형을 나타내었고, Y_1, Y_2, Y_3와 Y_4 모두 $p<0.005$로 유의적인 수준을 나타내었다(data not shown). 또한 종속변수에 관한 회귀계수는 Table 3에 나타냈으며, 이를 이용한 반응표면회귀식은 다음과 같다.

Table 2. D-optimal design arrangements and the observed responses

Exp. No.	Factors[1)]			Responses[2)]			
	X_1	X_2	X_3	Y_1 Observed	Y_2 Observed	Y_3 Observed	Y_4 Observed
1	1:1:3[3)]	2	30	2.42±0.26[4)]	1.66±0.19	1.09±0.04	0.83±0.05
2	1:1:3	6	30	3.45±0.21	9.86±0.94	4.91±2.72	3.91±1.11
3	1:3:9	6	30	8.21±0.40	19.26±0.36	15.31±0.37	9.25±0.58
4	1:1.66:5	2	30	3.83±1.51	2.78±0.93	2.33±1.08	1.28±0.12
5	1:3:9	3.33	30	4.90±0.76	12.07±0.88	8.39±3.45	5.58±1.14
6	1:3:9	2	90	9.85±0.12	17.74±0.65	11.42±4.48	6.21±1.72
7	1:2.33:7	6	90	15.94±1.71	31.27±0.54	25.17±0.59	13.08±0.21
8	1:1:3	3.33	90	8.68±1.60	11.35±0.95	8.28±1.12	3.27±2.03
9	1:2.33:7	2	180	12.79±0.83	23.90±0.63	20.75±1.25	10.47±0.49
10	1:1.66:5	6	180	24.75±1.84	27.69±0.72	26.30±1.83	11.49±0.57
11	1:3:9	4.66	180	22.17±0.78	29.39±0.50	27.85±2.69	12.93±0.07
12	1:1:3	2	270	13.26±0.50	16.74±0.75	15.34±1.19	7.31±0.70
13	1:1:3	6	270	28.71±0.41	21.92±0.96	22.05±0.60	10.67±1.99
14	1:3:9	2	270	22.80±0.28	28.33±0.92	24.64±3.96	12.21±1.24
15	1:3:9	6	270	46.10±0.57	25.27±0.46	26.12±1.27	9.84±0.54
16	1:2:6	4	270	29.63±0.60	26.61±0.55	26.19±1.15	12.31±1.32
17	1:2:6	4	270	28.46±1.54	29.11±0.86	24.29±2.66	11.84±0.83
18	1:2:6	4	270	32.30±0.01	27.77±0.37	26.52±1.67	11.69±0.61
19	1:2:6	4	270	30.55±1.55	27.98±0.67	26.91±1.59	11.05±0.77

[1)]X_1=Molar ratio of reaction substrates (Ca : PEE : StEE), X_2=enzyme amount (%), X_3=reaction time (min).
[2)]Y_1=sn-2 position of palmitic acid+stearic acid (%), Y_2=POS (%), Y_3=SOS (%), Y_4=POP (%).
[3)]Molar ratio=canola oil : palmitic ethyl ester : stearic ethyl ester.
[4)]Results are means of triplicates±standard deviation.

Table 3. Regression coefficients and significance of the second-order polynomials after backward elimination for Y_1, Y_2, Y_3, and Y_4

Variables	Y_1[4)]		Y_2[5)]		Y_3[6)]		Y_4[7)]	
	Coefficient (β)	P value	Coefficient (β)	P value	Coefficient (β)	P value	Coefficient (β)	P value
Intercept	19.282	3.894×10^{-8}	27.116	7.332×10^{-10}	24.013	3.936×10^{-10}	11.319	7.780×10^{-9}
X_1[1)]	2.307	4.764×10^{-3}	2.780	1.069×10^{-3}	2.502	6.150×10^{-4}	1.278	2.572×10^{-3}
X_2[2)]	5.351	4.332×10^{-6}	2.876	7.089×10^{-4}	3.197	6.913×10^{-5}	1.288	2.117×10^{-3}
X_3[3)]	10.150	1.312×10^{-8}	4.811	1.618×10^{-5}	5.770	4.887×10^{-7}	2.057	9.472×10^{-5}
X_1X_1	-1.182	2.048×10^{-1}	-2.637	9.850×10^{-3}	-2.574	3.905×10^{-3}	-1.033	3.909×10^{-2}
X_1X_3	2.345	3.416×10^{-3}	-0.899	1.684×10^{-1}	-0.281	5.920×10^{-1}	-0.400	2.348×10^{-1}
X_2X_3	2.425	3.489×10^{-3}	-1.615	2.692×10^{-2}	-0.644	2.486×10^{-1}	-0.803	3.311×10^{-2}
X_3X_3	0.035	9.777×10^{-1}	-4.181	4.503×10^{-3}	-3.632	3.525×10^{-3}	-1.688	1.876×10^{-2}

[1-3)]X_1=molar ratio of substrates (canola oil : palmitic ethyl ester : stearic ethyl ester), X_2=enzyme amount (%), X_3=reaction time (min).
[4-7)]Y_1=sn-2 position of palmitic acid+stearic acid (%); Y_2=POS (%); Y_3=SOS (%); Y_4=POP (%).

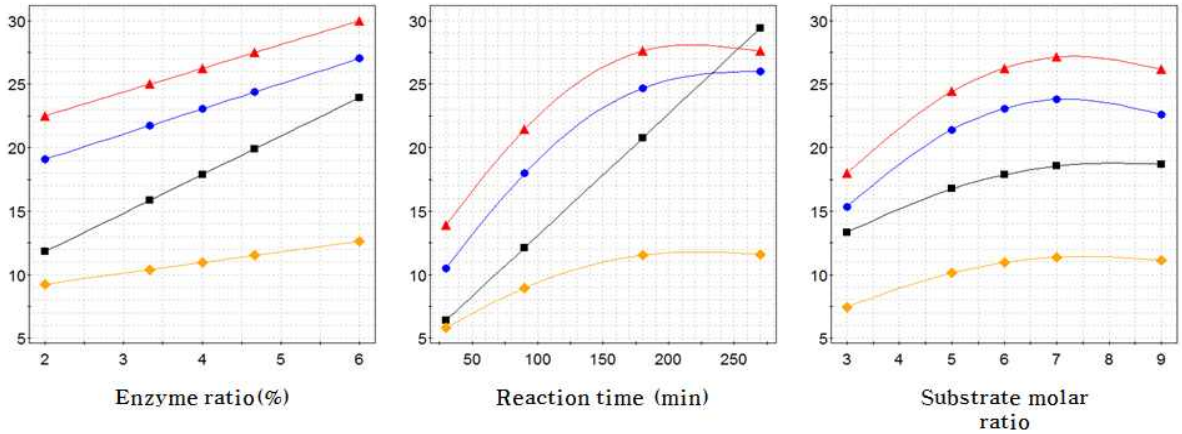

Fig. 3. Prediction plot for Y_1, Y_2, Y_3 and Y_4. ■, Y_1; ▲, Y_2; ●, Y_3; ◆, Y_4. Y_1=sn-2 position of palmitic acid+stearic acid (%); Y_2=POS (%); Y_3=SOS (%); Y_4=POP (%).

$$Y=\beta_0+\sum_{i=1}^{3}\beta_i X_i+\sum_{i=1}^{3}\beta_{ii}X_i^2+\sum_{i=1}^{2}\sum_{j=i+1}^{3}\beta_{ij}X_iX_j$$

Y_1(acyl-migration=palmitic acid+stearic acid % at sn-2 position)=$19.282+2.307X_1+5.351X_2+10.150X_3-1.182X_1X_1+2.345X_1X_3+2.425X_2X_3+0.038X_3X_3$

Y_2(POS, %)=$27.116+2.780X_1+2.876X_2+4.811X_3-2.637X_1X_1-0.899X_1X_3-1.615X_2X_3-4.181X_3X_3$

Y_3(SOS, %)=$24.013+2.502X_1+3.197X_2+5.770X_3-2.574X_1X_1-0.281X_1X_3-0.644X_2X_3-3.632X_3X_3$

Y_4(POP, %)=$11.319+1.278X_1+1.288X_2+2.057X_3-1.033X_1X_1-0.400X_1X_3-0.803X_2X_3-1.688X_3X_3$

독립 변수인 기질의 몰비율(X_1)과 효소의 양(%, X_2), 반응시간(min, X_3)들 중 acyl-migration과 코코아버터의 주요 TAG 조성인 POS, SOS, POP의 합성에 영향을 미치는 정도를 알아보았다(Fig. 3, Table 3). 우선 sn-2 위치의 지방산 변화를 가져오는 acyl-migration은 전반적으로 반응시간에 따라 가장 큰 증가치를 보였으며, 반응효소의 양과 기질의 몰비율이 증가할 때에도 다소 증가하는 모습을 보여 주었다(Fig. 3). 이러한 경향은 Xu 등(10)이 연구한 실험에서 acyl-migration은 반응 시간과 효소의 비율에 비례한다는 보고 내용과도 일치하는 결과를 나타내었다. 한편, POS(Y_2)와 SOS(Y_3), POP(Y_4)의 값도 X_3의 증가가 가장 큰 영향을 끼치는 것으로 나타났다(Table 3). 따라서 본 실험의 결과에서 acyl-migration은 반응시간에 가장 큰 영향을 받았고, 이후 반응효소의 양 그리고 기질의 몰비율의 순으로 영향을 받는다는 것을 알 수 있었다. 이는 효소농도 증가에 따라 재구성지질 함량이 증가하는 Cho 등(14)과 Senanayke와 Shahidi(15)가 연구한 내용과도 일치하였다. 특히, Y_2과 Y_3 그리고 Y_4는 반응시간(X_3)이 늘어남에 따라 그 값들이 상승하다가 약 180 min 이후 감소하는 경향을 모두 나타내었고, 기질의 몰비율(X_1)에 대해서도 비율을 높일수록 증가하는 경향을 보인 후 Ca : PEE : StEE=1:2.33:7의 비율에서부터 감소하는 경향을 보였다(Fig. 3). 또한 반응효소의 양(2, 4, 6%)에 따라 반응시간과 기질의 비율의 변화에 따른 acyl-migration 정도(Y_1)와 POS(Y_2)의 관계를 등고선으로 나타내보았다. Acyl-migration(sn-2 위치의 palmitic acid+stearic acid area %)의 발생 정도는 사용된 반응 효소량이 같을 경우 기질의 비율(X_1) 또는 반응시간(X_3)이 커짐에 따라 높게 나타났다. 따라서 대부분의 고급 코코아버터 대체지인 CBE의 경우에 sn-2 위치에 포화지방산이 약 10% 정도 존재하기 때문에 sn-2 위치에 palmitic acid와 stearic acid가 적어도 10%를 넘지 않으려면 반응효소의 양이 6%일 경우에 반응시간은 적어도 50 min은 넘지 않아야 acyl-migration을 최소화하여 코코아버터와 유사한 대칭형 TAG 조성을 가진 재구성지질을 합성할 수 있을 것이라는 점을 예측할 수 있었다(Fig. 4).

반응표면분석에 따른 코코아버터 유사 재구성지질의 합성

Ca와 PEE, StEE를 기질로 하고 Lipozyme TLIM을 이용하여 반응을 한 주된 이유는 코코아버터와 유사한 TAG 조성을 가지는 재구성지질을 합성하는 것이다. 즉, 코코아버터의 70% 이상의 TAG가 포화(saturated)-불포화(unsaturated)-포화(saturated)형의 대칭형 구조를 가지고 있기 때문에, 반응 중 sn-2 위치 지방산 조성의 변화를 일으키는 acyl-migration(Y_1)은 최소로 일어나야 하며 POS(Y_2)와 SOS(Y_3), POP(Y_4)는 최대로 일어나는 조건을 최적화해야 한다.

Modde 5.0을 이용하여 최적화된 반응기질의 몰비율은 Ca : PEE : StEE=1:3:9이었으며, 반응효소의 양은 6%, 반응시간은 40 min으로써 이때에 acyl-migration(sn-2 위치의 palmitic acid+stearic acid %)은 8.07%, POS의 함량은 22.24%, SOS의 함량은 16.64% 그리고 POP의 함량은 9.87%로 예측되었다. 한편, 최적화 조건에 따라 합성을 진행하여 위치별 지방산을 분석한 결과는 Table 1에 나타내었다. 전체 지방산은 stearic acid 36.27과 oleic acid가 35.99 area%로 나타났으며, 다음으로 palmitic acid가 13.01 area%로 높은 비율을 차지하였다. sn-2 위치에는 oleic acid가 65.54 area%로 가장 많이 함유되어 있었으며 palmitic acid는 4.85 area

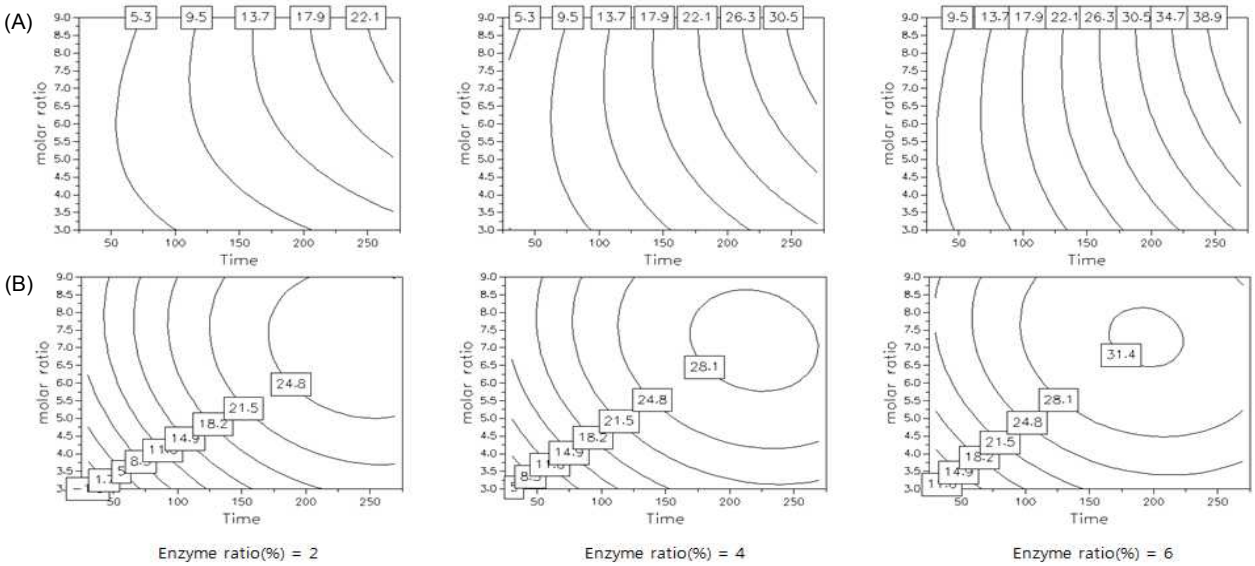

Fig. 4. Response contour plots for Y_1 (A) and Y_2 (B) at different enzyme amount of 2, 4, and 6%. Y_1=sn-2 position of palmitic acid+stearic acid (%); Y_2=POS (%).

%, stearic acid는 5.58 area%로 총포화지방산이 10.43 area %로 측정되었다. TAG의 조성은 POS의 함량이 25.31 area%로 가장 높게 나타났으며, 다음으로 SOS는 19.79, POP는 11.22 area%로 나타났다. 총 TAG의 조성 비율에서 포화(saturated)-불포화(unsaturated)-포화(saturated)형의 대칭형 구조 비율이 총 56.32 area%로 나타났으며, 이는 대칭형 TAG의 조성이 높은 유지일수록 코코아 버터의 예민한 융점의 원인이 되는 점과 비교하여 볼 수 있었다.

요 약

본 연구에서는 카놀라유(canola oil)를 이용하여 코코아버터 유사 재구성지질 합성의 최적조건을 연구하였다. 반응기질로는 카놀라유와 palmitic ethyl ester와 stearic ethyl ester를 이용하였으며, 효소는 Lipozyme TLIM을 사용하여 반응기질의 몰비율과 반응효소의 양, 반응시간을 독립변수로 하고, D-optimal 계획에 의한 반응표면분석에 따라 합성을 실시하였다. 반응을 통해 acyl-migration은 최소로 일어나며, POS 및 SOS, POP의 함량은 최대로 합성되는 조건을 최적화 조건으로 결정하였다. D-optimal 계획에 의한 반응표면분석을 실행한 결과, sn-2 위치 지방산 조성의 변화를 일으키는 acyl-migration(Y_1)은 최소로 일어나고 POS(Y_2)와 SOS(Y_3), POP(Y_4)는 최대로 일어나는 조건은 기질의 몰비율은 canola oil : palmitic ethyl ester : stearic ethyl ester= 1:3:9이며, 반응효소의 양은 6%이고, 반응시간은 40 min이었다. 이와 같은 반응조건으로 합성된 재구성지질의 acyl-migration(% of palmitic acid+stearic acid, Y_1)은 10.43%, POS(Y_2)의 함량은 25.31%, SOS(Y_3)는 19.79%, 그리고 POP (Y_4)는 11.22%로 측정되었다.

감사의 글

본 연구는 2011년도 농림수산식품부 농림기술개발사업의 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Chang MK, Abraham G, John VT. 1990. Production of cocoa butter-like fat from interesterification of vegetable oils. *J Am Oil Chem Soc* 67: 832-834.
2. Tanaka Y, Irinatsu T, Noguchi A, Kobayashi T. 1987. Substitute composition for cocoa butter. *US Patent* 4705692.
3. Buchgraber M, Ulberth F, Anklam E. 2004. Cluster analysis for the systematic grouping of genuine cocoa butter and cocoa butter equivalent samples based on triglyceride patterns. *J Agric Food Chem* 52: 3855-3860.
4. Lee KT, Akoh CC. 1998. Structured lipids: synthesis and application. *Food Rev Int* 14: 17-34.
5. Lee KT, Foglia TA. 2000. Synthesis, purification and characterization of structured lipids produced from chicken fat. *J Am Oil Chem Soc* 77: 1027-1034.
6. Akoh CC. 1995. Structured lipid: enzymatic approach. *INFORM* 6: 1055-1061.
7. Lee KT, Akoh CC. 1966. Immobilized lipase-catalyzed production of structured lipids with eicosapentaenoic acid at specific positions. *J Am Oil Chem Soc* 73: 611-615.
8. 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.
9. Xu X. 2000. Enzymatic production of structured lipids: process reactions and acyl migration. *INFORM* 11: 1121-1131.
10. Xu X, Skands ARH, Hoy CE, Mu H, Balchen S, Adler-Nissen J. 1998. Production of specific-structured lipids by enzymatic interesterification: elucidation of acyl migration by response surface design. *J Am Oil Chem Soc* 75: 1179-1198.
11. Jans YS. 2002. Prospect and situation of quality improve-

ment in oil seed rape. *Korean J Crop Sci* 47: 175-185.
12. Xu X, Fomuso LB, Akoh CC. 2000. Synthesis of structured triacylglycerols by lipase-catalyzed acidolysis in a packed bed bioreactor. *J Agric Food Chem* 48: 3-10.
13. 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.
14. Cho EJ, Lee JH, Lee KT. 2004. Optimization of enzymatic synthesis condition of structured lipids by response surface methodology. *Korean J Food Sci Technol* 36: 531-536.
15. Senanayke SPJN, Shahidi F. 2002. Enzyme-catalyzed synthesis of structured lipids via acidolysis of seal (*Phoca groenlandica*) blubber oil with capric acid. *Food Res Int* 35: 745-752.

(2011년 5월 20일 접수; 2011년 9월 7일 채택)