CNU Journal of Agricultural Science Vol. 40, No. 4, pp. 367-375, December 2013
DOI: http://dx.doi.org/10.7744/cnujas.2013.40.4.367

효소적 Acyl migration을 이용한 비대칭형 재구성지질(1,2-disaturated-3-unsaturated glycerol)의 합성 및 분석

현진우 · 이기택*

충남대학교 식품공학과

Enzymatic synthesis of asymmetric structured lipids containing 1,2-disaturated-3-unsaturated glycerol using acyl migration

Jin-Woo Hyeon, Ki-Teak Lee*

Department of Food Science and Technology, Chungnam National University, Deajeon 305-764, Korea

Received on 8 August 2013, revised on 28 August 2013, accepted on 16 September 2013

Abstract : The enzymatic interesterification was performed to produce structured lipids (SLs) with palm mid fraction (PMF) and stearic ethyl ester (STEE) for 1, 3, 6, 9, 12 and 15 hr at 80℃. The reaction was catalyzed by Lipozyme TLIM (immobilized lipase from *Thermomyces lanuginosus*, amount of 20% by weight of total substrates) in a shaking water bath set at 180 rpm. The optimum condition for synthesis of asymmetric SLs were: substrate molar ratio 1:0.5 (PMF:STEE, by weight), reaction time 6 hr, enzyme 20% (wt%, water activity=0.085) of total substrate and reaction temperature 80℃. After reaction at optimized condition, triacylglycerols (symmetrical and asymmetrical TAGs) from reactants were isolated. POP/PPO (1,3-palmitoyl-2-oleoyl glycerol or 1,2-palmitoyl-3-oleoyl glycerol), POS/PSO (palmitoyl-oleoyl-stearoyl glycerol or palmitoyl-stearoyl-oleoyl glycerol), SOS/SSO (1,3-stearoyl-2-oleoyl glycerol or 1,2-stearoyl-3-oleoyl glycerol) were obtained by solvent fractionation. Finally, refined SLs contained stearic acid of 16.91%. Solid fat index and thermogram of the refined SLs were obtained using differential scanning calorimetry. The degree of asymmetric triacylglycerol in the refined SLs was analyzed by Ag-HPLC equipped with evaporated light scattering detector (ELSD). The refined SLs consisted of symmetric TAG of 41.15 area% and asymmetric TAG of 58.85 area%.

Key words **:** Interesterification, Asymmetric triacylglycerol, Acyl migration, Structured lipids

I. 서 론

고체지 혹은 반고체지의 경우 결정형태에 따라 크게 α, β`, β 형으로 구분 할 수 있는데, 이들 결정형은 유지가로 식품에 이용될 때 서로 다른 특성을 보인다. 일반적으로 α형에서 β`형, β형으로 갈수록 융점이 높아지고 tri-acylglycerol(TAG)의 구조가 조금 더 치밀해지는 특징이 있다. 특히, 비대칭형 유지의 경우 β`형의 결정형을 가지려는 성질이 강하므로 가소성이 필요한 식품에 응용하기가 용이하다(Matsuno and Adachi, 1993). 한편, 새로운 TAG 조성물을 합성할 경우 sodium methoxide 등의 알칼리 촉매를 사용하는 화학적 에스테르 교환 반응을 이용할 수 있는데 가공유지업체에서도 이러한 방법을 이용하여 여러 종류의 가공 유지 제품을 생산하고 있다. 화학적 합성반응의 경우 공정 컨트롤이 비교적 간단하고, 소량 다품종 형태의 가공유지 생산에 적합할 수 있으나 에너지 소비가 크고, 부반응으로 인한 by-product가 생성될 수 있다는 단점이 있다. 반면, 효소를 이용하여 반응하게 되면 반응 온도가 낮아져 에너지 소모가 적으며 효소 반응에 의한 TAG 분자 내 지방산의 재배열을 이용하여 새로운 기능성 재구성지질(Structured lipids, SLs)을 생성할 수 있다(Lee and Akoh, 1998; Jennings et al., 2010).

본 연구에서는 palm mid fraction(PMF)과 stearic ethyl ester(STEE)를 기질로 하고 효소적 intersterfication 반

***Corresponding author:** Tel: +82-42-821-6729
E-mail address: ktlee@cnu.ac.kr

응을 이용하여 비대칭형 유지(1,2-disaturated-3-unsaturated glycerol)의 함량이 높은 재구성지질을 합성하였다. 최적 조건을 통해 획득한 재구성지질의 비대칭형 함량 정도를 높이기 위하여 column fractionation과 solvent fractionation을 진행하였으며, 최종생성물의 이화학적 특성은 gas chromatography(GC) 및 reversed-phase HPLC (RP-HPLC) 분석을 통해 확인하였다. 이외에 differential scanning calorimetry(DSC), silver ion HPLC 등을 이용한 분석을 진행하였으며 cocoa butter(CB)와의 blending을 통하여 실제 식품 산업에서의 응용 가능성을 제시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료 및 시약

본 실험에서 사용된 팜중부유(palm mid fraction, PMF)는 CJ Corp. (Incheon, Korea)에서 제공받아 사용하였으며, stearic ethyl ester(STEE)는 ㈜네오메가(Daejeon, Korea)에서 제공받아 사용하였다. 재구성 지질의 합성 및 acyl migration 반응을 위하여 사용된 효소는 *Thermomyces lanuginosus* immobilized lipase(TLIM)이며, *Thermomyces lanuginosus*로부터 획득한 lipase를 silica에 고정화 하여 얻어진 granulated 효소이다. 이는 Novo Nordisk Biochem North American Inc. (Franklinton, North Carolina, USA)에서 제작되었다. 유지의 sn-2 position의 지방산 조성을 분석하기 위해 사용된 pancreatic lipase(TypeⅡ, crude)는 Sigma-Aldrich chemical Co.(St Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Gas Chromatography(GC) 분석에 사용된 fatty acid methyl ester 표준물질은 Supelco(37 component FAME Mix)에서 구입하여 사용하였고, 모든 기기분석에는 HPLC grade의 용매를 이용하였다.

2. PMF와 STEE의 효소적 합성

본 실험에서는 PMF와 STEE를 1:0.5(mol/mol) 비율로 사용하였으며 acyl migration의 최적화를 위하여 80℃에서 반응을 진행하였다(Alim et al., 2008). 합성반응은 185 rpm의 항온교반수조에서 진행하였으며, 효소의 수분활성도에 따른 재구성 지질 TAG 조성 변화를 확인하기 위하여 효소의 수분활성도를 0.085, 0.333, 0.513으로 조절하여 반응하였다. 각각의 시료는 1, 3, 6, 9, 12, 15시간마다 취하여 그 결과를 확인하였으며, 모든 기질은 반응이 끝난 후 PTFE syringe로 lipase를 제거하여 재구성지질(structured lipids, SLs)의 생성물만을 냉장 보관하였다.

3. 재구성지질의 MAG, DAG, ester 제거

Interesterification을 통해 획득한 재구성지질은 TAG 뿐 아니라 일부 monoacylglycerol(MAG), diacylglycerol (DAG), ester 등을 함께 포함하고 있다. 재구성지질 중 순수한 TAG만을 획득하기 위하여 이들을 제거하는 과정을 진행하였으며 그 방법은 다음과 같다. Ester의 경우 42.5 cm × 4 cm 크기의 florisil column을 이용하여 제거를 하였으며 재구성지질 10 g 기준 100 g의 florisil을 사용하였다. 재구성지질을 hexane과 diethyl ether 부피비 95: 5 용매 500 mL에 충분히 녹인 후 column을 통과시켜 ester를 분리하였으며, 그 후 diethyl ether 500 mL을 column에 통과시켜 ester가 제거된 재구성지질을 획득하였다. MAG, DAG의 경우 silica gel column을 이용하여 제거를 하였으며, 재구성지질 1 g 기준 2 g의 silica gel을 사용하였다(Patrick et al., 2009). 약 200 mL의 hexane을 이용하여 재구성지질을 충분히 녹인 후 column을 통과시켜 재구성지질을 획득하였다.

4. Solvent fractionation을 통한 재구성지질의 분별

재구성지질을 구성하고 있는 여러 종류의 TAG 중 S-S-U/S-U-S(1,2-disaturated-3-unsaturated glycerol or 1,3-disaturated-2-unsaturated glycerol) 형태의 TAG만을 획득하기 위하여 acetone 침전법을 통해 재구성지질을 분획함으로써 최종생성물을 획득하였다(Lee and Foglia, 2000). 유지의 9배에 해당하는 acetone을 첨가한 후 15시간동안 18℃에서 방치하여 침전된 고체상을 제거함으로써, S-S-S(S: saturated fatty acid)로 구성된 TAG를 제거하였다. 그 후 같은 양의 아세톤을 첨가한 후 6℃에서 15시간동안 방치하여 액체상을 제거함으로서, S-U-U(U: unsaturated fatty acid)로 구성된 TAG를 제거하였다.

5. Reversed-phase HPLC를 이용한 triacylglycerol(TAG) 조성 분석

재구성지질과 최종생성물의 TAG 조성을 알아보기 위하여 reversed-phase HPLC(RP-HPLC, Younglin, Anyang, Korea)를 이용하여 분석을 진행하였다. 분리를 위한 column으로는 Nova-Pak C18 (60Å, 4 μm, 3.9 x 150 mm I.d., Waters, Milford, Ireland)을 사용하였으며 detector는 sedex 75 evaporative light scattering detector(ELSD, Dedere Alfortvill, France)로 40℃, 2.2 bar로 설정하여 분석하였다. 이동상은 기울기용리로 acetonitrile(solvent A), iso-propanol과 hexane 부피비 2:1 용매(solvent B)를 사용하였으며, 유속은 1 mL/min으로 흘려주었다. 시료 10 mg을 vial에 취하여 10 mL의 chloroform에 녹인 후 auto sampler(Marathon, Spark Holland, Emmen, Netherlands)를 이용하여 20 μL 주입하였다. 시료 주입 후 solvent A와 B의 부피 비를 80:20 비율로 흘려주기 시작하여 45분까지 54:46으로 변화시킨 뒤 15분간 유지시켰다. 그 후 용매 A와 B의 부피 비를 54:46에서 65분까지 80:20으로 변화시킨 뒤 70분까지 유지함으로써 분석을 마쳤다.

6. 지방산 조성 분석

재구성지질과 최종생성물의 TAG 지방산 조성 분석을 위하여 thin layer chromatography(TLC) 및 gas chromatography(GC) 분석을 시행하였다. 시료 50 μL을 200 μL의 chloroform(HPLC grade)에 용해시켜 n-hexane, diethyl ether, acetic acid 50:50:1(v/v) 비율의 전개용매를 이용하여 TLC silica plate(20 × 20 cm, Merck KGaA, Darmstadt, Germany)에 전개하였다. 분리된 TAG band를 획득하여 GC분석을 위해 methylation을 실시하였다. Methylation 방법은 식품의약품안전청에서 고시한 「식품 중 기준규격 미설정물질의 시험방법」을 참고하여 실시하였다(Korean Food and Drug Administration, 2011). 획득한 TAG band를 test tube에 취하여 1.5 mL의 0.5 N NaOH 메탄올 용액을 넣고 vortex 한 후 100℃ water bath에서 5분간 중탕하였다. 중탕이 끝나고 20-30℃에서 충분히 냉각 한 후 BF_3 용액을 2 mL을 넣고 vortex 한 후 100℃에서 3분간 중탕하였다. 냉각 후 메틸에스테르화 된 지방산을 추출하기 위하여 iso-octane 2 mL과 saturated NaCl solution 1 mL을 첨가한 후 충분히 vortex 하고 원심분리기(2000 rpm, 5 min)를 사용하여 층을 나누었다. 상층액을 취하여 anhydrous sodium sulfate column을 통과시켜 수분과 이물질을 제거한 후 얻어진 iso-octane층을 GC에 주입하여 지방산 조성 분석을 실시하였다. GC(Hewlett-Packard 6890 series, Avondale, PA, USA) 분석을 위한 column으로 SP-2560(100 m × 0.25 mm i.d., 0.2 μm film thickness, Supelco, Bellefonte, PA, USA)을 사용하였으며, column oven 온도는 100℃에서 4분간 유지시킨 후 240℃까지 분당 3℃씩 증가시켜 15분간 유지시킴으로써 peak의 분리 효율을 높였다. Carrier gas는 He으로 0.7 mL/min을 유지시켰고 injector 온도와 detector 온도는 각각 225℃와 285℃로 설정하였다. 각각의 시료는 1 μL 주입하여 분석하였으며, split ratio는 200:1의 비율이었다. 각 분석은 두 반복씩 실행하였으며 평균값과 표준편차를 이용하여 데이터로 산출하였다.

7. Pancreatic lipase analysis에 의한 위치별 지방산 조성 분석

재구성지질과 최종생성물의 sn-2 및 sn-1,3 위치 지방산 조성 분석을 위하여 sn-1,3 위치에 특이적으로 작용하는 pancreatic lipase(from porcine pancreas, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)에 의한 가수분해를 실행하였다. 약 7 mg의 시료를 test tube에 취한 뒤 1 M Tris-HCl buffer(pH 7.6) 7 mL, 0.05% 담즙산염 1.75 mL, 2.2% $CaCl_2$ 0.7 mL을 각각 넣고 7 mg의 pancreatic lipase을 첨가하였다. 혼합물을 1분간 vortex 한 후 pancreatic lipase의 최적반응 조건을 만들어 주기 위하여 37℃에서 8분간 가온해주었으며 3분, 6분마다 30초씩 vortex 하여 효소가 더욱 효과적으로 반응 할 수 있도록 하였다. 반응이 완료된 후 diethyl ether 4 mL을 첨가하여 상층 액을 취하였으며 sodium sulfate column을 통하여 미량이나마 잔존할 수 있는 수분 및 불순물을 제거해주었다. 이를 n-hexane, diethyl ether, acetic acid의 50:50:1(v/v/v) 전개용매를 사용하여 TLC plate에 전개시켰다. 전개가 완료된 TLC plate로부터 R_f 값이 0.03인 2-monoacylglycerol(MAG) 부분만을 취하여 BF_3-methanol을 이용한 methylation을 진행 한 후 GC를 이용하여 지방산 조성 분석을 실시하였다. 분석된 결과의 sn-1,3 및 sn-2 조성 계산은 Fomuso와

Akoh의 계산식을 이용하였다(2002).

sn-1,3(%) = [3 x TAG(%) - sn-2(%)] / 2

8. Solid fat index 및 melting point 측정

Differential scanning calorimetry(DSC)는 시료의 물리적인 상태가 변할 때 발생하는 열의 흡수나 방출을 측정하여 시료의 solid fat index(SFI)를 측정하는 분석 기기이다. DSC(model DSC 2010, TA Instruments, New Castle, USA)를 이용하여 코코아버터, 팜중부유, 최종생성물의 solid fat index(SFI)를 측정하였다. 분석 시 calibration을 위한 base line은 빈 cell을 통한 분석결과를 이용하였고, 각각의 시료는 약 7 mg을 취하여 분석하였다. Thermogram을 얻기 위해 80℃에서 10분 동안 유지한 후 10℃/min의 비율로 -60℃까지 냉각하여 그 상태에서 10분 동안 유지시켜주고 다시 80℃까지 5℃/min의 비율로 승온 하도록 설정하여 분석을 실시하였다(Lee and Foglia, 2000). SFI는 전체 용융 구간의 총△H(J/g, enthalpy) 대비 각 구간별(1℃) 단위 에너지 변화량을 통하여 구하였다.

코코아버터, 팜중부유, 최종생성물의 melting point 측정은 AOCS official method Cc 3-25에 제시된 방법에 따라 수행하였다(AOCS, 1990). 반응기질과 최종생성물의 melting point를 측정하기 위하여 시료를 완전히 용해시키고, capillary tube(Chase Scienific Glass Inc., 75 mm × 1.2 mm I,D., USA)의 약 1 cm정도 양만큼 채취하여 -8℃에서 1시간정도 보관한 후 사용하였다. 증류수가 담긴 비커에 magnetic stirrer를 이용하여 전체적으로 열전도가 균일하게 이루어지도록 하였으며 cupric sulfate($CuSO_4$) 용액이 든 column을 이용하였다. 시료가 담긴 capillary tube는 온도계 하단에 부착하여 column에 넣은 후, 중탕하여 분석을 실행하였다. 온도가 상승함에 따라 시료가 capillary tube를 타고 상승하기 시작할 때의 온도를 slip melting point로 지정하였고, 분석은 2차례 반복 실행하였다.

9. Ag-HPLC를 이용한 TAG 분석

최종생성물을 구성하고 있는 TAG의 비대칭형 정도를 확인하기 위하여 Ag-HPLC(Younglin, Anyamg, Korea)를 이용한 기기분석을 진행하였다. 분리를 위한 column으로는 silver ion column(ChromSpher 5 lipids 250 × 4.6 mm I.d., Varian, Netherlands)을 사용하였으며 detector는 Sedex 75 evaporative light scattering detector(ELSD, Dedere Alfortvill, France)로 40℃, 2.2 bar로 설정하여 분석하였다. 이동상은 기울기용리로 n-hexane, iso-propanol, acetonitrile의 100:0.1:0.1(v/v/v) 용매(solvent A), n-hexane, iso-propanol, acetonitrile 100:1:1(v/v/v) 용매(solvent B)를 사용하였으며 유속은 1 mL/min으로 흘려주었다. 시료 10 mg을 vial에 취하여 10 mL의 hexane에 녹인 후 auto sampler(Marathon, Spark Holland, Emmen, Netherlands)를 이용하여 20 μL를 주입하였다. 시료 주입 후 solvent A와 B를 100:0(v/v) 흘려주기 시작하여 5분간 유지시킨 후 50분까지 80:20(v/v)으로 변화시켰으며, 그 후 60분까지 50:50(v/v)으로 변화시켜 주었다. 이 상태를 1분간 유지한 후 62분까지 100:0(v/v) 비율로 바꾼 후 8분간 유지함으로써 분석을 마쳤다(Harfmann et al., 2008). 또한 실제 식품산업에서의 응용 가능성을 확인해보기 위하여 대칭형 유지(1,3-disaturated-2-unsaturated glycerol)를 다량 함유하고 있는 코코아버터와 최종생성물을 비율 별로 blending하여 비대칭형 정도가 어떻게 변화하는지 확인하였다.

10. 통계 처리

실험 결과는 평균±표준편차로 나타내었고, 각 그룹간의 유의성은 SAS(statistical analysis system, version 8.01) program의 duncan's multiple range test를 실시하여 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 검정하였다(SAS, 2000).

III. 결과 및 고찰

1. 수분활성도와 반응시간에 따른 acyl migration 최적 조건 확립

팜중부유(palm mid fraction, PMF)와 stearic ethyl ester(STEE)를 1:0.5(mole/mole)의 비율로 항온교반수조에서 합성하여 얻어진 재구성지질(structured lipids, SLs)의 지방산 조성을 분석한 후 그 결과값을 Table 1에 나타내었다. 반응 전 기질로 사용한 PMF의 sn-2 position을 분석한 결과 포화지방산인 palmitic acid(C16:0)와 stearic acid(C18:0)의 합이 약 7.11 area%, 불포화지방산

Table 1. Fatty acid composition (area%) of structured lipids at sn-2 position during the different water activity (Aw=0.085, 0.333, 0.513) and different reaction time (0, 1, 3, 6, 9, 12, 15 hr).

(Unit: area%)

Fatty acid	Palm mid fraction(PMF) : Stearic ethyl ester(STEE) = 1:0.5[1)] (mole/mole). A_w=0.085						
	Reaction Time (hr)						
	0	1	3	6	9	12	15
16:0	6.58±0.03[2)e]	24.37±0.23[d3)]	42.71±0.24[c]	43.02±0.37[c]	48.97±0.23[b]	49.65±0.20[a]	48.67±0.42[b]
18:0	0.53±0.00[f]	8.50±0.07[e]	16.56±0.06[d]	28.58±0.21[a]	20.58±0.14[c]	20.74±0.10[c]	21.13±0.08[b]
18:1	86.21±0.04[a]	62.03±0.25[b]	37.59±0.23[c]	26.22±0.21[f]	28.05±0.24[d]	27.34±0.14[e]	27.84±0.20[d]
18:2	6.68±0.01[a]	5.10±0.04[b]	3.14±0.04[c]	2.18±0.06[e]	2.40±0.13[d]	2.27±0.04d[e]	2.36±0.14d[e]
∑SFA[4)]	7.11±0.03	32.87±0.30	59.37±0.30	71.60±0.58	69.55±0.37	70.39±0.30	69.80±0.50
∑USFA[5)]	92.89±0.05	67.13±0.29	40.73±0.27	28.40±0.27	30.45±0.37	39.61±0.18	30.20±0.34
Fatty acid	Palm mid fraction(PMF) : Stearic ethyl ester(STEE) = 1:0.5, A_w=0.333						
	Reaction Time (hr)						
	0	1	3	6	9	12	15
16:0	6.58±0.03[f]	26.82±0.16[e]	44.05±0.21[d]	49.40±0.33[b]	49.04±0.45[b]	50.11±0.28[a]	46.17±0.30[c]
18:0	0.53±0.00[f]	9.43±0.10[e]	18.20±0.08[d]	20.46±0.16[c]	23.06±0.24[b]	20.88±0.33[c]	25.48±0.13[a]
18:1	86.21±0.04[a]	58.90±0.21[b]	34.32±0.27[c]	27.79±0.14[d]	25.59±0.25[f]	26.69±0.17[e]	26.10±0.31[f]
18:2	6.68±0.01[a]	4.85±0.04[b]	3.43±0.03[c]	2.35±0.03[d]	2.31±0.04[d]	2.32±0.13[d]	2.25±0.11[d]
∑SFA	7.11±0.03	36.25±0.26	62.25±0.29	69.86±0.49	72.10±0.69	70.99±0.61	71.65±0.43
∑USFA	92.89±0.05	63.75±0.25	37.75±0.30	30.14±0.17	27.90±0.29	29.01±0.30	28.35±0.44
Fatty acid	Palm mid fraction(PMF) : Stearic ethyl ester(STEE) = 1:0.5, A_w=0.513						
	Reaction Time (hr)						
	0	1	3	6	9	12	15
16:0	6.58±0.03[f]	23.73±0.27[e]	42.00±0.21[d]	48.32±0.38[c]	49.05±0.31[bc]	50.64±0.28[a]	49.33±0.52[b]
18:0	0.53±0.00[f]	8.09±0.14[e]	17.27±0.07[d]	20.35±0.20[c]	21.46±0.11[ab]	21.83±0.17[a]	21.29±0.30[b]
18:1	86.21±0.04[a]	63.08±0.31[b]	37.52±0.17[c]	28.82±0.17[d]	27.16±0.28[e]	25.14±0.18[f]	27.11±0.35[e]
18:2	6.68±0.01[a]	5.10±0.10[b]	3.21±0.11[c]	2.51±0.01[d]	2.33±0.14[d]	2.39±0.07[d]	2.27±0.13[d]
∑SFA	7.11±0.03	31.82±0.41	59.27±0.28	68.67±0.58	70.51±0.42	72.47±0.45	70.62±0.82
∑USFA	92.89±0.05	68.18±0.41	40.73±0.28	31.33±0.18	29.49±0.42	27.53±0.25	29.38±0.48

[1)]Molar ration of palm mid fraction with stearic ethyl ester.
[2)]All values are mean±SD (n=2)
[3)]Means in the same column with different letters significantly different ($p<0.05$)
[4)]Total saturated fatty acid(%) = C16:0(%) + C18:0(%)
[5)]Total unsaturated fatty acid(%) = C18:1(%) + C18:2(%)

인 oleic acid(C18:1)와 linoleic acid(C18:2)의 합이 약 92.89 area%를 이루는 것을 확인하였다. 일반적으로 acyl migration 반응은 효소의 수분활성도가 높을수록 잘 일어나는 것으로 알려져 있다(Xu and Balchen, 1998). 본 실험 결과 역시 마찬가지로 효소의 수분활성도가 0.085에서 0.513까지 증가함에 따라 sn-2 position에서의 acyl migration에 의하여 palmitic acid와 stearic acid의 총 함량이 71.60 area%에서 72.47 area%까지 증가하는 것을 확인하였다. 반면 palmitic acid를 제외한 stearic acid의 함량만을 살펴보면 그 값이 28.58 area%에서 21.83 area%로 오히려 감소하는 경향을 나타내었는데, 이러한 원인으로는 80℃의 높은 반응 온도가 영향을 미쳤을 것이라 예상할 수 있었다(Yang et al., 2005). 본 연구에서는 stearic acid의 함량이 28.58 area%로 가장 높으며 palmitic acid와 stearic acid의 함량이 71.60 area%인 6시간(A_w=0.085)을 최적 조건으로 선정하여 실험을 진행하였다.

2. RP-HPLC를 이용한 TAG의 조성 분석

반응에 사용된 기질, 합성된 재구성지질, 최종생성물의 TAG 조성을 reversed-phase HPLC(RP-HPLC)를 이용하여 분석하였으며 분석 결과를 Fig. 1을 통해 나타내었다. 반응 기질로 사용된 PMF의 주요 TAG 조성은 POP/PPO (1,3-palmitoyl-2-oleoyl glycerol or 1,2-palmitoyl-3-oleoyl glycerol)로써 약 92.21 area%를 차지하였으며, 그 외 PLP, POO, POS/PSO(L: linoleic acid, S: stearic acid)의 TAG 조성을 가지는 것을 확인할 수 있었다. 한편, 효소적 inter-esterification 반응을 통하여 합성된 재구성 지질의 TAG 조성을 분석한 결과, 주요 TAG 조성은 POP/PPO, PPP, POS/PSO, PPS 등으로 확인되었고, 그 외 PLO, PLP, OOO, POO, SOO, SOS(SSO), PSS 등의 TAG 또한 확인할 수 있었다. 반응 전과 반응 후의 TAG 조성을 비교한 결과, 반응시간이 증가함에 따라 POP/PPO의 함량은 92.21 area%에서 27.86 area% 까지 감소하였으며, stearic acid를 포함한 SOO, POS/PSO, PPS, SOS/SSO, PSS 의 함량은 각각 0 area%에서 2.72 area%로, 5.75 area%에서 22.12 area% 로, 0 area%에서 17.03 area% 로, 0 area%에서 0.09 area% 로, 0 area%에서 4.47 area% 로 증가한 것을 확인 할 수 있었다. 이는 sn-1,3 position에 특이적으로 작용하는 TLIM 효소의 반응에 의해 stearic acid가 POP에 결합함에 따라 POS/PSO, SOS/SSO 등의 TAG가 생겨나고, 이후 acyl migration에 의해 PPS, PSS, SSS 등으로 지방산이 재배열 되면서 TAG의 조성이 변화된 것이라 사료된다. RP-HPLC를 통한 결과와 앞서 실행한 sn-2 position의 GC 분석 결과를 통해 재구성지질의 TAG 조성은 POP, SOS 형태의 대칭형 유지보다는 PPO, PSO, SSO 등의 비대칭형 유지가 주요 TAG 인 것을 확인할 수 있었다.

3. Solvent fractionation과 column을 이용한 재구성지질의 정제

최적 합성 조건에서 얻어진 재구성지질은 비대칭형 TAG (1,2-disaturated-3-unsaturated glycerol)뿐 아니라 대칭형의 TAG(1,3-disaturated-2-unsaturated glycerol) 및 PPS, PSS, SSS(P: palmitic acid, S: stearic acid) 등

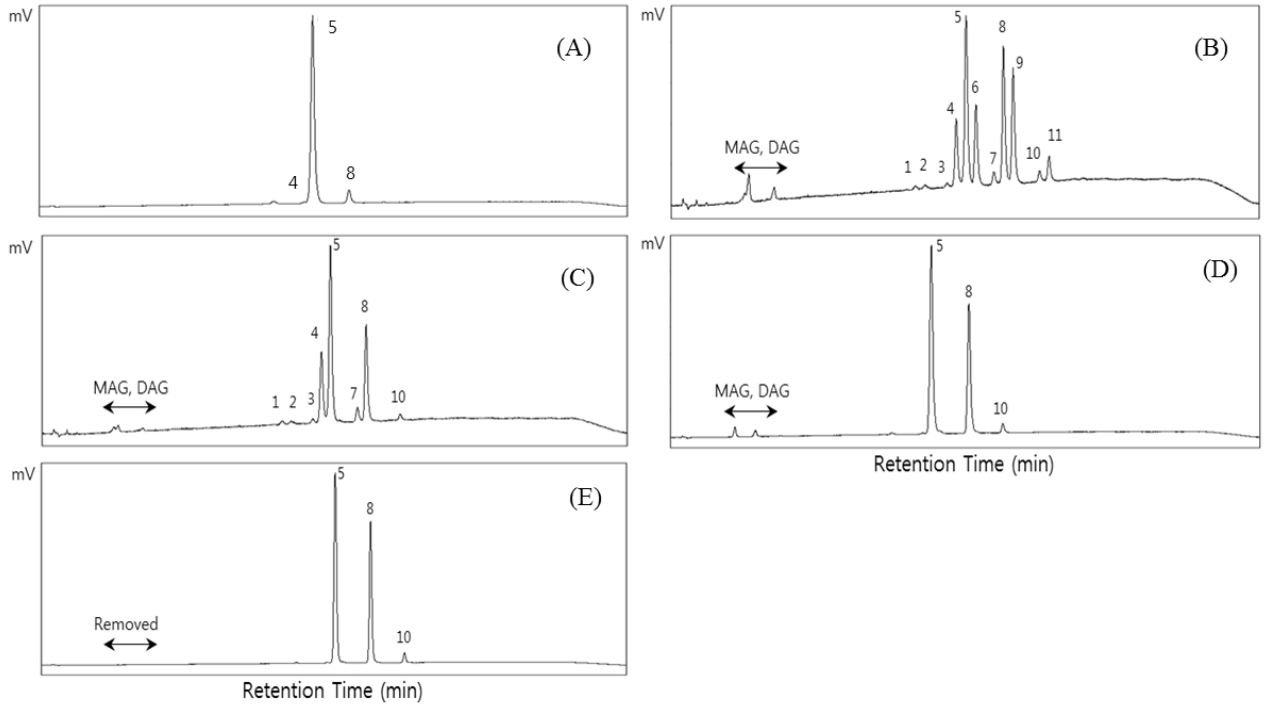

Fig. 1. Chromatogram from the reversed-phase high performance liquid chromatography separation of A: palm mid fraction (PMF), B: structured lipids (PMF:STEE=1:0.5, lipozyme TLIM 20 wt%, 6hr). C: after acetone fractionation at 18℃, D: after acetone fractionation at 6℃, E: after remove MAG, DAG and fatty acid. 1: PLO, 2: PLP, 3:OOO 4: POO, 5: PPO (POP), 6: PPP, 7: SOO 8: PSO (POS), 9: PPS, 10: SSO/SOS, 11: PSS.

의 TAG 또한 포함하고 있다. 재구성지질 중 원하는 TAG 형태인 1,2-disaturated-3-unsaturated glycerol의 함량을 증가시키기 위하여 acetone 침전법을 이용한 solvent fractionation을 진행하였다. Fractionation 진행 정도에 따라 분획 전, 18℃ 분획 후, 6℃ 분획 후의 TAG 조성을 RP-HPLC를 통하여 분석하였고 그 결과를 Fig. 1을 통해 나타내었다. 재구성지질에 포함되어 있는 에스테르는 florisil column을 통하여, MAG와 DAG는 silica gel column을 이용하여 제거하였으며 효과적인 제거가 이루어졌는지는 RP-HPLC 분석 결과를 통해 확인 하였다.

4. 위치별 지방산 조성 분석

반응 전 기질로 사용한 팜중부유(palm mid fraction, PMF)와 분획을 통해 획득한 최종생성물의 지방산 조성을 gas chromatography(GC)를 통해 분석 하였으며 그 결과를 Table 2에 나타내었다. 기질로 사용된 PMF의 지방산 분석 결과 57.01%의 palmitic acid(C16:0), 34.57%의 oleic acid(C18:1)가 주요 지방산으로 나타났으며 그 외 5.40%의 stearic acid(C18:0), 3.02%의 linoleic acid(C18:2)를 포함하고 있음을 확인하였다. Fractionation을 통해 획득한 최종생성물의 경우 palmitic acid, oleic acid, linoleic acid의 값이 각각 46.85 area%, 34.36 area%, 1.87 area%까지 감소하였으며 stearic acid의 경우는 16.91 area%까지 증가하는 것을 확인 할 수 있었다. 또한 반응 전 후 sn-2 position의 지방산 조성에서는 palmitic acid가 6.58 area%에서 44.35 area%까지, stearic acid가 0.53 area%에서 11.14 area%까지 변화하는 것을 확인 할 수 있는데, 이 두 가지 결과를 통하여 반응 중 TLIM 효소에 의한 acyl migration 현상이 일어났다는 결론을 내릴 수 있었다. 결과적으로 최종생성물의 약 55.49 area%가 1,2-disaturated-3-unsaturated glycerol 형태의 TAG임을 확인 할 수 있었다.

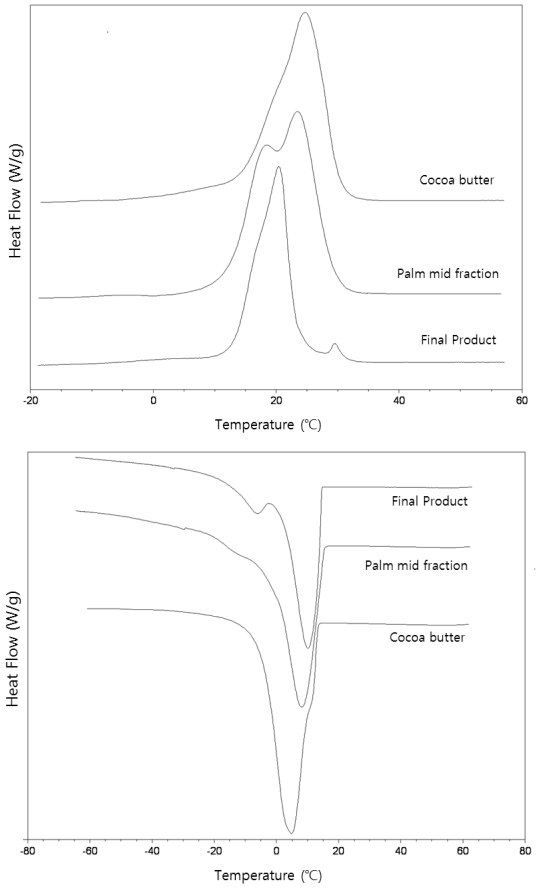

Fig. 2. Differential scanning calorimetry (DSC) endothermic and exothermic heating curve of cocoa butter (CB), palm mid fraction (PMF) and final product.

Table 2. Fatty acid composition of palm mid fraction (PMF) and final product that reaction during 6 hours.

(Unit: area%)

Fatty acid	Palm mid fraction			Final product		
	TAG	sn-2	sn-1,3	TAG	sn-2	sn-1,3
16:0	57.01±0.13[1)]	6.58±0.13	73.33±0.25	46.85±0.30	44.35±0.21	48.10±0.55
18:0	5.40±0.03	0.53±0.01	3.85±0.04	16.91±0.16	11.14±0.08	19.80±0.19
18:1	34.57±0.08	86.21±0.31	20.83±0.28	34.36±0.27	42.01±0.33	30.54±0.57
18:2	3.02±0.01	6.68±0.17	1.99±0.06	1.87±0.13	2.50±0.03	1.56±0.21
∑SFA[2)]	62.41±0.16	7.11±0.14	77.18±0.29	63.76±0.46	55.49±0.29	67.90±0.74
∑USFA[3)]	37.59±0.09	82.89±0.48	22.82±0.34	36.23±0.40	44.51±0.36	32.10±0.78

[1)]All values are mean±SD (n=2)
[2)]Total saturated fatty acid(%) = C16:0(%) + C18:0(%)
[3)]Total unsaturated fatty acid(%) = C18:1(%) + C18:2(%)

5. Melting point 측정 및 DSC 분석을 통한 solid fat index(SFI) 측정

SFI는 지질의 물리적인 외관 및 spreadability에 있어 많은 영향을 미치며, 실제 유지식품 산업에 있어 중요한 품질 평가 기준 중의 하나로 작용하고 있다. DSC를 이용해 분석한 팜중부유, 코코아버터, 최종생성물의 chromatogram을 Fig. 2에 나타내었다. 기질로 사용된 팜중부유(PMF)의 경우 16-28℃ 부근에서 고체지의 함량이 급격히 감소하는 것을 확인할 수 있었으며 16, 20, 24℃ 및 28℃에서 고체지 함량이 각각 84.50, 57.56, 25.98, 3.97%로 분석되었다. 코코아버터(CB)의 경우 18-28℃ 부근에서 고체지의 함량이 급격히 감소하는 것을 확인할 수 있었으며 16, 20, 24℃ 및 28℃에서 고체지 함량이 각각 89.45, 69.50, 31.77, 3.69%로 분석되었다. 반면, 최종생성물의 경우 16-24℃ 부근에서 고체지의 함량이 급격히 감소하는 것을 확인할 수 있었으며 16. 20, 24℃ 및 28℃에서 고체지 함량이 각각 85.83, 39.48, 7.37, 3.20%로 분석되었다. 16-28℃ 구간에서 SFI 곡선의 slope를 비교한 결과 최종생성물의 slope 기울기가 다른 유지의 slope 기울기에 비하여 더 가파른 것을 확인할 수 있었으며, 이를 통하여 최종생성물이 상대적으로 좁은 범위에서 급격히 녹는 것을 알 수 있었다. 또한 팜중부유, 코코아버터, 최종생성물 모두 사람의 체온인 35℃에서 결정을 이루지 않는 액체상을 유지하는 것을 확인할 수 있었으며 각각의 melting point를 측정한 결과 팜중부유의 경우 약 34.8℃, 코코아버터의 경우 32.4℃, 최종생성물의 경우 33.5℃임을 확인하였다. 최종생성물의 경우 전체적으로 코코아버터와 매우 비슷한 물성을 나타내었으며, 이를 통하여 최종생성물이 코코아버터의 대체지로 일부 사용 가능할 것이라 예상하였다. 또한 국제식품규격위원회에서 공표한 마아가린 및 스프레드유지의 국제 규격을 보면 이들 제품의 경우 유지의 양이 10-90%(wt%)이며 20℃에서 스프레드가 가능한 고체상이어야 한다고 규정하고 있다. 최종생성물의 경우 20℃에서 SFI가 39.48%으로 고체상을 유지하며 스프레드가 가능하다는 점을 미루어 보아 마아가린 제조에 있어서도 일부 이용이 가능할 것이라 예상된다.

6. Ag-HPLC를 통한 TAG 조성 분석

Silver ion column을 이용하여 TAG를 분석하게 되면 위치에 따른 이중 결합의 수와 기하학 이성체를 분리하기 때문에 S-S-S(포화-포화-포화), S-U-S(포화-불포화-포화), S-S-U(포화-포화-불포화), S-U-U(포화-불포화-불포화), U-S-U(불포화-포화-불포화)를 분리할 수 있다. 이를 통하여 최종생성물에서 palmitic acid(C16:0), stearic acid(C18:0), oleic acid(C18:1)와 같은 각각의 지방산의 위치 분포를 확인하고 1,3-disaturated-2-unsaturated glycerol(S-U-S), 1,2-disaturated-3-unsaturated glycerol (S-S-U)의 함량을 확인하였다. 추가적으로 코코아버터와의 blending을 통하여 각각의 혼합비에 따른 조성의 변화

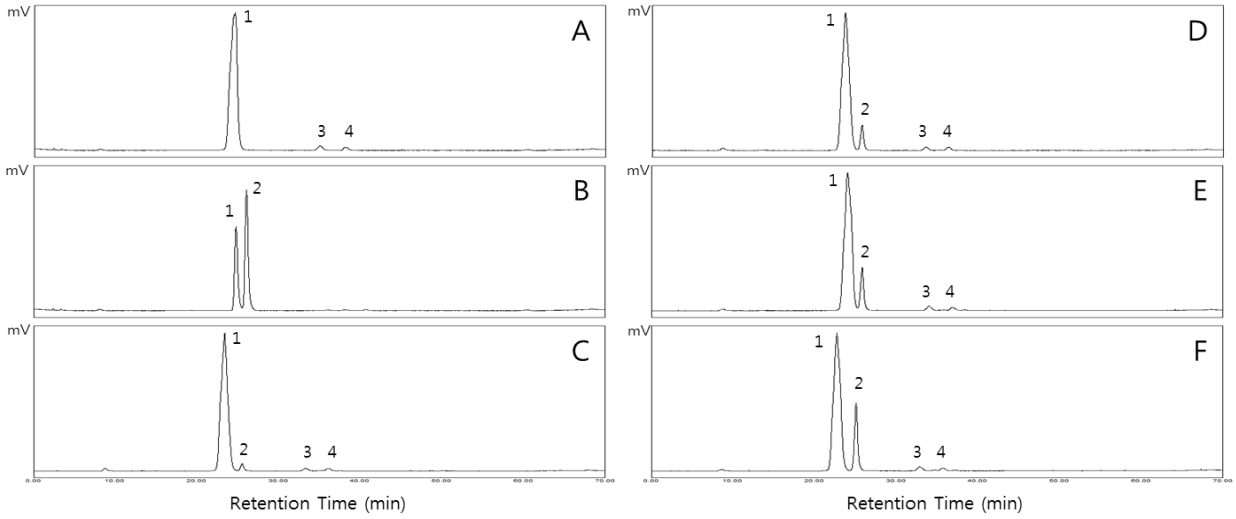

Fig. 3. Chromatogram from the Ag-HPLC separation of A: cocoa butter, B: final product, C: 10% final product + 90% cocoa butter, D: 20% final product + 80% cocoa butter, E: 30% final product + 70% cocoa butter, F: 40% final product + 60% cocoa butter. 1: S (Saturated fatty acid)-U (Unsaturated fatty acid)-S, 2: S-S-U, 3: S-U-U, 4: U-S-U.

를 측정하여 그 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 코코아버터의 경우 주요 TAG가 S-U-S 형태로써 96.48%를 차지하였으며 그 외 1.95%의 S-U-U, 1.57%의 U-S-U 등의 조성을 확인 할 수 있었다. 반면 최종생성물의 경우 S-U-U, U-S-U 등의 TAG는 관찰되지 않았으며 S-U-S가 41.15%, S-S-U가 58.85%인 것을 확인하였다. 코코아버터와 최종생성물을 60:40 비율까지 blending 함에 따라서 기존 94.48% 함량의 S-U-S는 79.20% 까지 감소하였으며, 코코아버터에는 존재하지 않았던 S-S-U의 함량은 18.10%까지 증가하였다. 일반적으로 초콜릿 대체지로 이용되고 있는 비대칭형 유지인 cocoa butter replacer(CBR)의 경우 20% 한도 내에서 사용할 경우 초콜릿의 물성 유지 및 안정도에 영향을 미치지 않는 것으로 보고되어 있다(El-Mallah and Megahed, 1998). 본 연구에서 합성을 통해 획득한 최종생성물의 경우 1,2-disaturated-3-unsaturated glycerol의 함량이 약 58% 정도이므로 실제 초콜릿에서는 약 35%정도가 이용가능하다고 판단된다.

IV. 결 론

본 연구에서는 비대칭형 유지(1,2-disaturated-3-unsaturated glycerol)의 함량이 증가된 재구성 지질을 합성하기 위하여 palm mid fraction(PMF)과 stearic ethyl ester(STEE)를 1:0.5(mol/mol) 비율로 반응을 진행하였다. Triacylglycerol의 sn-1과 3위치에 특이성을 가지는 고정화 효소인 TLIM을 이용하여 재구성 지질을 합성하였으며 acyl migration 반응을 촉진하기 위하여 효소의 한계 온도인 80℃에서 반응을 진행하였다. 반응은 185 rpm의 batch-type reactor에서 실행되었으며 1, 3, 6, 9, 12, 15 hr 동안 반응한 결과 효소의 수분활성도가 0.085 일 때, 6시간 반응에서 최적 조건임을 확인 할 수 있었다. 최적 조건을 통해 획득한 재구성 지질의 비대칭형 함량 정도를 높이기 위하여 column fractionation과 solvent fractionation을 진행하였으며, 최종적으로 획득한 최종생성물의 경우 약 16.91% 정도의 stearic acid(C16:0)를 함유하고 있는 것을 확인하였다. Differential scanning calorimetry (DSC) 분석을 통하여 최종생성물의 solid fat index(SFI)를 확인하여 초콜릿 대체지와 마아가린 대체지로서의 이용가능성을 확인 하였고, Ag-HPLC 분석을 통하여 분석한 결과 전체 TAG 중 약 58.85% 정도가 비대칭형 TAG임을 확인하였다.

감사의 글

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

참 고 문 헌

Alim MA, Lee JH, Shin JA, Lee YJ, Choi MS, Akoh CC, Lee KT. 2008. Lipase-catalyzed production of solid fat stock from fractionated rice bran oil, palm stearin, and conjugated linoleic acid by response surface methodology. Food Chemistry 106:712-719.

AOCS. 1990. Official methods and recommended practices (4th). American Oil Chemists' Society, Champaign, Ⅱ, USA. Cc 3-25.

El-Mallah MH, Megahed MG. 1998. Studies on cocoa butter-replacer mixtures suitable for the local chocolate production. Grasas Aceites 49:446-449.

Fomuso LB, Akoh CC. 2002. Lipase-catalyzed acidolysis of olive oil and caprylic acid in a bench-scale packed bed bioreactor. Food Research International 35:15-21.

Harfmann RG, Julka S, Cortes HJ. 2008. Instability of hexane-acetonitrile mobile phases used for the chromatographic analysis of triacylglycerides. Journal of Separation Science 31:915-920.

Jennings BH, Shewfelt RL, Akoh CC. 2010. Food applications of a rice bran oil structured lipid in fried sweet potato chips and an energy bar. Journal of Food Quality 33:679-692.

Korean Food and Drug Administration. 2011. NLS Standard Operation Procedure Analytical Methods.

Lee KT, Akoh CC. Structured lipids: synthesis and applications. 1998. Food Reviews International 14:17-34.

Lee KT, Foglia TA. 2000. Fractionation of chicken fat triacylglycerols: synthesis of structured lipids with immobilized lipases. Journal of Food Science 65(5):826-831.

Matsuno R, Adachi S. 1993. Lipid encapsulation technology - Techniques and applications to food. Trends in Food Science & Technology 4:256-261.

SAS Institute, Inc. 2000. SAS User's Guide. Statistical analysis systems institute. Cary NC, USA.

Xu X, Balchen S, Høy CE, Adler-Nissen, J. 1998. Pilot batch production of specific-structured lipids by lipase-catalyzed interesterification: preliminary study on incorporation and acyl migration. Journal of the American Oil Chemists' Society 75(2):301-308.

Yang T, Fruekilde MB, Xu X. 2005. Suppression of acylmigration in enzymatic production of structured lipids through temperature programming. Food Chemistry 92:101-107.