J Korean Soc Food Sci Nutr
43(1), 93～101(2014)

한국식품영양과학회지
http://dx.doi.org/10.3746/jkfn.2014.43.1.093

효소적 반응을 이용한 비대칭형 1,2-Distearoyl-3-Oleoyl-*rac*-Glycerol 혼합물의 생성 및 융점 특성

김진영 · 이기택†
충남대학교 식품공학과

Enzymatic Interesterification and Melting Characteristic for Asymmetric 1,2-Distearoyl-3-Oleoyl-*rac*-Glycerol Triacylglycerol Enriched Product

Jin Young Kim and Ki Teak Lee†
Dept. of Food Science and Technology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

ABSTRACT Asymmetric 1,2-distearoyl-3-oleoyl-*rac*-glycerol (SSO) triacylglycerol (TAG) is used as a cocoa butter replacer (CBR). In this study, it was produced by lipase-catalyzed interesterification of fully hydrogenated soybean oil (FHSBO) and oleic ethyl ester (OEE) in a batch type reactor at 75°C, 250 rpm. Different molar ratios (FHSBO : OEE=1:1, 1:2 and 1:3, w/w) and various reaction times (1, 2, 3, 4, and 5 hr) were also tested. The optimized condition for SSO was a FHSBO : OEE molar ratio of =1:1 at reaction times of 2, 3, 4, and 5 hr. Enzymatic synthesis generated SSO/SOS, as well as the other TAGs (e.g., PSO/POS, SOO/OSO, SSS), ethyl esters, monoacylglycerol (MAG), and diacylglycerol (DAG). After scale-up, fractionation by solvent (methanol and acetone) fractionation and column chromatography was applied. To reduce ethyl esters, high-melting TAGs (e.g., SSS), and SOO/OSO in reactants, solvent fractionation was applied. Using a silica gel column (sample : silica gel=2:1, wt%), MAG and DAG were removed at 25°C. The major fatty acid composition of the final products (with a high SSO/SOS content) was palmitic acid (C16:0, 10.9～12.9 area%), stearic acid (C18:0, 52.2～54.9 area%), and oleic acid (C18:1, 34.2～35.5 area%). In reversed-phase HPLC analysis, the major TAG species of the final product (FHSBO : OEE=1:1, 2 hr) were SSO/SOS (82.31 area%) and PSO/POS (14.51 area%). Based on the $[SS]^+ : [SO]^+$ ratio obtained by RP-HPLC/APCI-MS, the final product had a higher SSO (AAB type TAG) content than cocoa butter (CB). The solid fat index (SFI) of CB and the final product obtained were similar with a narrow melting point range around ～32 to 35°C.

Key words: fully hydrogenated soybean oil, interesterification, fractionation, asymmetric triacylglycerol, cocoa butter replacer

서 론

코코아버터(cocoa butter, CB)는 광택성, 부러짐성, 그리고 체온에서 빠르게 녹는 특성 등을 가지고 있기 때문에 초콜릿 또는 제과산업에서 사용되고 있다(1). 이와 같은 코코아버터의 물리적 특성은 1-palmitoyl-2-oleoyl-3-stearoyl-*sn*-glycerol(POS), 1,3-distearoyl-2-oleoyl-*sn*-glycerol(SOS), 1,3-dipalmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycerol (POP)과 같은 상대적으로 단순한 triacylglycerol(TAG) 조성에 기인하는 것으로 알려져 있다(2).

그러나 코코아버터는 서아프리카에서 집중적으로 생산되는 천연자원이기에(3) 공급이 안정치 못할 수 있고, 비교적 고가의 유지이기 때문에 코코아버터를 대체할 수 있는 대체지의 개발연구가 진행되어 왔다. 이와 같은 코코아버터 대체지의 종류는 CB와 물리화학적 특성이 유사한 cocoa butter equivalent(CBE)와 화학적 특성은 CB와 다소 다르나 물리적 특성이 비슷한 cocoa butter substitutes(CBS)와 cocoa butter replacer(CBR)로 분류할 수 있다. CBE는 CB와 유사한 fatty acid와 TAG 조성을 가지기 때문에 비교적 손쉽게 CB와 혼합이 가능한 것에 반하여, lauric계 유지를 기반으로 하고 있는 CBS는 CB와의 상용성이 극히 낮다(4). 한편 CBR은 CB와 비슷한 지방산 조성을 가지고 있어 CB의 일부를 대체할 수 있으며(5), 수소 경화 또는 분획된 팜유나 수소경화된 식물성 유지가 CBR의 주요 원료로 사용된다(2). CB는 대부분 대칭형 TAG로 구성되어 있어 β형의 결정형을 나타내는 것에 반하여, CBR은 β′형의 결정형을 나타낸다(6). 따라서 1,2-distearoyl-3-oleoyl-*rac*-glycerol(SSO)과 같은 비대칭형 TAG는 β′형의 결정형에서 안정하면서도 융점이 CB와 유사하기 때문에 CBR로의 이용이 가능하다. 지금까지의 코코아버터 대체지 생산 및 특성연구와 관련한 연구들 중 Abigor 등(7)은 대두극도경화유와 팜유의 효소적

Received 8 August 2013; Accepted 31 December 2013
†Corresponding author.
E-mail: ktlee@cnu.ac.kr, Phone: +82-42-821-6729

interesterification을 이용한 코코아버터 유사지 생산연구와 코코아버터 유사지를 얻기 위한 palm olein과 stearic acid의 효소적 interesterification으로 생산된 유지의 분별과정 연구(8)를 보고하였다.

본 실험은 대두극도경화유(fully hydrogenated soybean oil, FHSBO)와 oleic ethyl ester를 주요 기질로 사용하여 코코아버터 대체유지(CBR)로서 사용가능한 비대칭형 TAG를 만들고자 하였다. *Thermomyces lanuginosus*로부터 유래한 고정화 효소인 Lipozyme TLIM을 사용하여 기질간의 interesterification을 수행하여 SSO와 같은 비대칭형 TAG 조성이 높게 예측되는 조건을 대량 합성하였다. 얻어진 반응물은 용매 및 column을 이용하여 분별을 수행하였고 최종적으로 얻어낸 생성물의 물리화학적 특성을 분석하였다.

재료 및 방법

실험 재료

본 연구에서 사용된 기질인 대두극도경화유와 oleic ethyl ester는 각각 C사(Seoul, Korea)와 (주)네오메가(Daejeon, Korea)로부터 제공받아 사용하였다. 합성을 위해 사용된 lipase는 *Thermomyces lanuginosa*로부터 유래한 고정화 효소인 TLIM으로, triacylglycerol 분자의 sn-1,3 위치에 특이적으로 작용하는 특성이 있으며 Novozymes사(Bagsvaerd, Denmark)에서 구입하였다. 유지의 sn-2 위치의 지방산 조성을 알아보기 위해 사용한 pancreatic lipase(type Ⅱ, crude)는 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. 한편, 반응물의 용매 분별(solvent fractionation)을 위하여 사용한 methanol, acetone, hexane은 normal-grade이었고 기기분석에 사용한 용매는 분석용 특급시약을 사용하였다.

대량 합성 조건 선정을 위한 screening 실험

1,2-Distearoyl-3-oleoyl-*rac*-glycerol과 같은 높은 비대칭형 TAG 조성이 예측되는 합성 조건을 선정하기 위하여 다음과 같은 실험을 진행하였다. 기질인 대두극도경화유와 oleic ethyl ester의 몰 비율이 1:1(50 g:17.9 g), 1:2, 1:3이 되도록 1 L의 3구 둥근 플라스크에 취하여 약 90~100°C에서 완전히 녹여 교반한 후, 총 반응 기질의 10 wt%에 해당하는 Lipozyme TLIM을 넣고 반응을 시작하였다. 반응 온도는 이중 자켓으로 제작된 항온수조의 순환되는 물을 사용하여 75°C로 유지하였으며, stirrer motor(MS-3060D, Mtops, Seoul, Korea)에 의하여 250 rpm으로 유지된 반달모양의 impeller를 사용하여 충분히 교반시키면서 5시간 동안 반응시켰다. 1, 2, 3, 4, 5시간마다 취한 반응물은 열을 가하며 0.5 μm PTFE syringe filter(13JP050AN, ADVANTEC, Tokyo, Japan)를 사용하여 lipase와 불순물을 제거하여 얻었다. 얻은 반응물은 위치별 지방산 조성 분석을 통하여 비교적 높은 SSO의 조성이 예측되는 조건인 기질의 몰 비율 1:1(FHSBO : OEE, w/w), 반응시간이 2, 3, 4, 5시간일 때를 선정하였다. 선정된 4가지의 조건은 각 조건별로 50 g의 대두극도경화유와 17.9 g의 oleic ethyl ester를 사용하여 대량 합성을 진행하였다.

용매 분별

대량 합성된 반응물은 용매 분별과 silica gel column을 통하여 정제하였으며, 용매 분별의 조건 및 방법은 Baliga과 Shitole(9)의 방법을 일부 수정하여 사용하였다. 먼저 합성하여 얻은 반응물에서 ethyl ester를 제거하기 위하여 TAG보다 ethyl ester를 쉽게 용해시키는 methanol의 용해 특성을 이용하여 methanol-fractionation을 진행하였다. 반응물과 methanol을 1:5(w/v) 비율로 50 mL의 vial에 취하여 충분히 용해시키고 교반한 후, room temperature인 25°C에서 3시간 동안 방치하여 층을 분리하였다. Solid층과 liquid층으로 분리된 두 층은 membrane filter를 이용해 solid층을 취하였으며, 이상의 과정을 2회 반복 진행하여 ethyl ester를 제거하였다. 이후 얻어진 TAG 반응물에서 tristearin(SSS)과 같은 높은 융점의 TAG들을 제거하기 위하여, 1:5(w/v) 비율의 반응물과 acetone을 50 mL vial에 넣고 충분히 용해한 후 vortex하여 25°C에서 3시간 동안 방치한 후에 membrane filter를 이용해 liquid층을 취했다. 그리고 얻어진 높은 융점의 TAG들이 제거된 반응물에서 1-stearoyl-2,3-dioleoyl-*sn*-glycerol(SOO)를 최대한 제거하기 위하여 acetone-fractionation을 4차례 반복하여 진행하였다. 이를 위해 1:9(w/v) 비율의 반응물과 acetone을 50 mL vial에 넣고 용해 및 교반한 후, 4°C로 유지된 incubator(SI-900R, Jeio Tech, Daejeon, Korea)에서 15시간 방치하여 solid층을 취했다. 이후 silica gel column을 통하여 monoacylglycerol(MAG)과 diacylglycerol(DAG)를 제거한 반응물은 다시 1:5(reactant : acetone, w/v) 비율의 acetone을 사용하여 분별 온도를 18°C로 설정하여 15시간 방치한 후, liquid층을 취하여 정제하였다.

Silica gel column을 이용한 MAG 및 DAG 분리

반응물에 존재하는 monoacylglycerol(MAG)과 diacylglycerol(DAG)의 함량을 줄이기 위하여 silica gel column을 사용하였다. 길이 9 cm, 폭 0.6 cm의 column에 silica gel 60(230~400 mesh ASTM, Merck, Columbia, MD, USA) 0.5 g을 취하여 column을 제조하였다. 이에 hexane 1 mL를 흘려 준 후, acetone-fractionation을 통해 낮은 SOO 조성을 가진 반응물 1 g을 hexane 25 mL에 용해시켜 silica gel column에 loading하였다. 이를 통하여 MAG와 DAG를 silica gel에 흡착시켜 제거하였다.

지방산 조성 분석

대량 합성 조건 선정을 위한 실험을 통해 얻은 반응물과 최종 생성물의 지방산 조성 분석은 Kim과 Lee(10)의 방법

을 일부 변경하여 사용하였다. Thin layer chromatography(TLC, 20×20 cm, Merck, Darmstadt, Germany)에 의하여 획득한 반응물의 TAG 부분만을 시험관에 취한 후 gas chromatograph(GC) 분석을 위하여 methylation을 실시하였다. 먼저 0.5 N NaOH의 methanol 용액을 1.5 mL 가하여 교반한 후, 5분 동안 100°C water bath에서 중탕시키고 충분히 냉각하였다. 이후 BF_3-methanol 2 mL를 넣고 다시 3분 동안 중탕시키고 충분히 냉각시킨 시험관에 isooctane 2 mL와 포화 NaCl 용액 1 mL를 가하여 1분간 vortex하였다. 상층액을 분리하기 위하여 1,500 rpm에서 5분간 원심분리기를 사용하였고, anhydrous sodium sulfate column을 이용하여 수분과 불순물을 제거한 후 농축하여 GC 분석에 사용하였다. GC(YL 6100GC, 6000 series GC system controller, Younglin, Anyang, Korea) 분석에 사용된 검출기는 flame ionized detector(FID)를 사용하였으며 column은 SP™-2560(biscyanopropyl polysiloxane, 100 m×0.25 mm i.d., 0.2 μm film thickness, Supelco, Bellefonte, PA, USA)을 이용하여 분석하였다. Carrier gas는 고순도 He으로써 1 mL/min의 유속을 유지하였다. Oven 온도는 5분 동안 150°C를 유지한 후 4°C/min씩 증가시켜 220°C에 도달하여 30분간 유지시켰으며 inject port 온도와 detector 온도는 각각 250°C, 260°C로 설정하였다. 시료는 1 μL 주입하여 총 분석시간 52.5분간 지방산 분석을 실행하였고, 분석은 두 번 반복 실시하여 평균값을 구하였다.

Pancreatic lipase 분석을 통한 위치별 지방산 조성 분석

대량 합성 조건 선정을 위한 실험을 통해 얻은 반응물과 최종 생성물의 sn-2 및 sn-1,3 위치의 지방산 조성 분석을 위하여 sn-1,3 위치에 특이적으로 작용하는 pancreatic lipase에 의한 가수분해반응을 실행하였다. 본 실험 방법은 Lee와 Akoh(11)의 방법을 일부 수정하여 사용하였다. 시험관에 약 7~10 mg 시료를 넣고 7 mL의 1 M tris-HCl buffer(pH 7.6), 1.75 mL의 0.05% 담즙산염, 0.7 mL의 2.2% $CaCl_2$를 가한 후, 시료의 양과 동일한 양의 pancreatic lipase를 첨가하여 1분간 충분히 교반하였다. 이를 37°C로 유지된 항온수조에서 3분간 반응시킨 후 30초 동안 교반하는 과정을 3회 반복하여 진행하였다. 반응이 끝난 시험관에 4 mL의 diethyl ether를 가하고 교반한 후, 원심분리기를 사용해 상층만을 분리하여 sodium sulfate anhydrous column으로 수분 및 불순물을 제거하였다. 이를 hexane, diethyl ether, acetic acid(50:50:1, v/v/v)의 전개용매를 사용한 TLC 분석을 통해 2-MAG band를 분리한 후, methylation을 실시하여 GC 분석에 사용하였으며 GC 분석방법은 지방산 조성 분석방법과 같다. 한편 sn-1,3 위치의 지방산 조성 계산식은 Fomuso와 Akoh(12)의 것을 사용하였으며 다음과 같다.

$$\text{Sn-1,3 (\%)}=[\text{3TAG (\%)}-\text{sn-2 (\%)}]/2$$

Reversed-phase HPLC를 이용한 TAG 조성 분석

분별에 따른 반응물의 TAG 조성 분석을 위하여 reversed-phase high performance liquid chromatography(RP-HPLC)를 사용하였으며, Moon 등(13)의 방법을 일부 변형하여 수행하였다. 기기는 Younglin SP930D dual pump(Yonglin)를 사용하였으며 column은 Nova-pak® C18 60 Å 4 μm(3.9×150 mm i.d., Waters, Milford, Ireland)를 사용하였다. Acetonitrile과 iso-propanol : hexane=2:1(v/v)을 각각 용매 A와 B로서 A : B=80%:20%에서 54%:46%로 45분까지 변화시킨 후 15분 동안 유지하였다. 그 후 65분까지 80%:20%로 변화시킨 다음 70분까지 분석하였으며, 유속은 1 mL/min이었다. 검출기는 40°C, 2.2 bar로 설정된 Sedex 75 evaporative light scattering detector(ELSD, Dedere, Alfortvill, France)를 사용하였다. 시료는 chloroform에 완전히 녹여 1 mg/mL의 농도로 10 μL 주입하였으며, 분석된 TAG의 partition number (PN)의 계산식은 다음과 같다.

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

RP-HPLC/APCI-MS를 이용한 TAG 이성질체 분석

합성 및 분별을 통해 얻은 최종 생성물의 TAG 분자구조를 규명하기 위하여 RP-HPLC/APCI-MS를 사용하였다. 본 연구에서 사용된 LC/MS는 HP 1100 series liquid chromatograph/Agilent 1200 series mass spectrometer (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA)를 사용하였으며, RP-HPLC 분석조건은 앞에서 서술한 내용과 같다. MS의 이온화 방식은 대기압 화학이온화(atmospheric pressure chemical ionization, APCI) 방법을 사용하였고, positive mode의 ion mode에서 150 V의 fragmentor voltage를 설정하여 분석하였다. TAG의 분자구조는 Mottram 등(14)이 제시한 ion fragment의 ion spectrum molecular weight 수치를 사용하여 확인하였다.

DSC 분석

Differential scanning calorimetry(Model DSC 2010, TA Instruments, New Castle, PA, USA)를 사용하여 시료의 물리적인 상태 변화로 인한 열량의 변화를 측정함으로써 흡열 및 발열 곡선을 측정하였으며, solid fat index(SFI) 측정은 Md.Ali와 Dimick(15)의 방법을 일부 수정하여 사용하였다. DSC의 calibration을 위해 빈 cell을 reference로 사용하여 baseline을 얻었으며, 각 분석 시료의 양은 7±1 mg을 취하여 분석하였다. 반응물의 melting 및 crystallization thermogram을 얻기 위한 가열 및 냉각조건은 초기 온도에서 80°C로 승온하여 10분 동안 유지한 다음, 10 °C/min의 비율로 -60°C까지 냉각하여 그 온도에서 10분 동안 유지한 후 다시 80°C까지 5°C/min의 비율로 승온하였다.

Slip melting point 측정

대량 합성 및 분별하여 얻은 최종 생성물과 코코아버터의 slip melting point를 측정하기 위하여 AOCS Official Method Cc 4-25(16)의 방법에 준하여 분석을 시행하였다. Capillary tube(75 mm×1.2 mm i.d., Chase Scientific Glass Inc., Rockwood, TN, USA)의 말단부에 완전히 용해된 시료를 1 cm 정도로 취하여 -20°C에서 10분 동안 응고시킨 후, 온도계 하단에 부착하여 cupric sulfate($CuSO_4$) 용액이 든 column에 넣었다. Column은 증류수가 담긴 비커에 넣고 교반가열판(PC-420D, Corning, Lowell, MA, USA)을 이용하여 stirrer로 교반하면서 전체적으로 균일한 열전도가 이루어지도록 하였고, 약 0.5°C/min으로 온도를 상승시켰다. 시각적인 관찰을 통하여 시료가 capillary tube를 타고 상승하기 시작할 때의 온도를 slip melting point로 지정하여 측정하였고, 2차례 반복 측정하여 평균값으로 나타내었다.

H^1-NMR 분석

최종 생성물의 MAG와 DAG, 그리고 TAG의 조성을 분석하기 위하여 H^1-NMR(600MHz FT-NMR, AVANCE III 600, Bruker BioSpin Corporation, Billerica, MA, USA)을 사용하였으며, Laszlo 등(17)의 방법을 일부 수정하여 사용하였다. 분석에 사용된 probe는 BBI Broadband probe이었으며, 0.1 g의 시료를 0.7 mL의 $CDCl_3$에 완전히 용해시킨 후 NMR tube(Norell, Landisville, NJ, USA)에 취하여 분석을 진행하였다.

통계 처리

실험 결과는 SAS(Statistical Analysis System) 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)를 이용하여 Duncan's multiple range test에 의해 각 시료간의 유의적인 차이를 $P<0.05$ 수준에서 검증하였다.

결과 및 고찰

반응물의 위치별 지방산 조성을 통한 합성 조건 screening 실험

대량 합성 조건 선정을 위한 실험으로 기질들의 몰 비율과 반응시간을 달리하여 얻은 반응물과 기질인 대두극도경화유(FHSBO)의 위치별 지방산 조성의 분석 결과는 Table 1과 같다. 대두극도경화유의 총 지방산 조성은 palmitic acid(C16:0) 17.0 area%와 stearic acid(C18:0) 79.8 area%, 그리고 oleic acid(C18:1) 3.2 area%로 확인되었으며, 특히 sn-2 위치에서 stearic acid가 91.6 area%로 나타나 주로 포화 지방산이 위치하는 것으로 나타났다. 한편 대두극도경화유와 oleic ethyl ester(OEE)의 1:1, 1:2, 1:3의 몰 비율과 반응시간(1, 2, 3, 4, 5 hr)에 따른 반응물의 지방산 조성을 분석한 결과, 전반적으로 palmitic acid, stearic acid, oleic

Table 1. Fatty acid composition of fully hydrogenated soybean oil (FHSBO), reactants and final products at the different molar ratio and reaction times

Fatty acid (area%)		TAG			Sn-2			Sn-1,3		
		C16:0	C18:0	C18:1	C16:0	C18:0	C18:1	C16:0	C18:0	C18:1
FHSBO		17.0±0.4	79.8±0.6	3.2±0.2	2.7±0.1	91.6±0.3	5.7±0.4	24.1±0.6	73.9±0.9	2.0±0.4
1:1[1)]	1 hr	13.0±0.0^{a}	63.3±0.2^{a}	23.7±0.2^{c}	5.5±0.1^{e}	84.3±0.1^{a}	10.2±0.0^{e}	16.7±0.1^{a}	52.8±0.2^{ab}	30.5±0.3^{ab}
	2 hr	12.7±0.3^{ab}	61.2±1.2^{ab}	26.2±0.9^{b}	8.3±0.1^{d}	78.4±0.2^{b}	13.3±0.0^{d}	14.9±0.4^{b}	52.5±1.8^{ab}	32.6±1.4^{ab}
	3 hr	12.9±0.0^{a}	58.9±0.6^{c}	28.2±0.6^{a}	9.1±0.1^{c}	74.0±0.0^{c}	16.9±0.2^{c}	14.8±0.1^{b}	51.3±0.9^{b}	33.9±1.0^{ab}
	4 hr	12.4±0.2^{ab}	58.5±1.1^{c}	29.1±1.2^{a}	10.1±0.1^{b}	71.5±0.0^{d}	18.3±0.1^{b}	13.6±0.3^{c}	51.9±1.6^{b}	34.5±1.9^{a}
	5 hr	12.2±0.4^{b}	60.4±0.7^{bc}	27.4±0.4^{ab}	11.5±0.2^{a}	69.1±0.2^{e}	19.4±0.1^{a}	12.6±0.7^{d}	58.1±4.0^{a}	29.4±3.2^{b}
1:2	1 hr	10.4±0.2^{a}	55.5±0.2^{a}	34.1±0.0^{c}	4.9±0.2^{c}	81.3±0.3^{a}	13.7±0.2^{e}	13.2±0.4^{a}	42.6±0.5^{ab}	44.3±0.1^{d}
	2 hr	10.2±0.0^{ab}	51.8±0.1^{b}	38.0±0.1^{b}	7.1±0.0^{b}	72.7±0.2^{b}	20.1±0.3^{d}	11.7±0.0^{b}	41.4±0.2^{b}	47.0±0.2^{ab}
	3 hr	10.2±0.1^{ab}	51.1±0.1^{b}	38.7±0.1^{b}	9.7±0.3^{a}	65.6±0.4^{c}	24.7±0.1^{c}	10.5±0.0^{c}	43.8±0.0^{a}	45.7±0.1^{bc}
	4 hr	10.3±0.1^{ab}	48.9±0.5^{c}	40.9±0.4^{a}	9.6±0.4^{a}	63.1±0.3^{d}	27.3±0.1^{b}	10.6±0.4^{c}	41.7±0.9^{b}	47.6±0.6^{a}
	5 hr	10.1±0.1^{b}	49.7±0.7^{c}	40.2±0.6^{a}	9.4±0.3^{a}	60.5±0.3^{e}	30.1±0.1^{a}	10.4±0.3^{c}	44.3±1.2^{a}	45.3±0.9^{cd}
1:3	1 hr	8.3±0.0^{bc}	52.3±0.1^{a}	39.4±0.2^{e}	4.1±0.1^{e}	78.4±0.3^{a}	17.5±0.2^{e}	10.4±0.0^{a}	39.2±0.4^{b}	50.4±0.3^{b}
	2 hr	8.1±0.2^{c}	47.3±0.4^{b}	44.5±0.2^{d}	7.3±0.0^{c}	63.3±0.2^{b}	29.5±0.2^{d}	8.6±0.2^{c}	39.4±0.5^{b}	52.1±0.3^{a}
	3 hr	8.5±0.0^{ab}	45.8±0.1^{c}	45.7±0.1^{c}	6.6±0.2^{d}	60.2±0.2^{c}	33.2±0.0^{c}	9.4±0.2^{b}	38.6±0.3^{b}	51.9±0.1^{a}
	4 hr	8.3±0.1^{bc}	45.3±0.1^{d}	46.4±0.2^{b}	7.9±0.0^{b}	54.5±0.1^{d}	37.6±0.2^{b}	8.5±0.2^{c}	40.6±0.1^{a}	50.8±0.3^{b}
	5 hr	8.6±0.0^{a}	44.0±0.1^{e}	47.4±0.1^{a}	8.5±0.4^{a}	51.2±0.5^{e}	40.3±0.1^{a}	8.7±0.1^{c}	40.4±0.4^{a}	51.0±0.3^{b}
1:1[2)]	2 hr	12.9±0.0^{a}	52.2±0.0^{c}	35.0±0.0^{b}	10.7±0.2^{a}	68.1±0.0^{a}	21.2±0.2^{c}	14.0±0.1^{a}	44.2±0.0^{d}	41.9±0.1^{b}
	3 hr	11.3±0.0^{b}	53.2±0.0^{b}	35.5±0.0^{a}	11.2±0.4^{a}	68.4±0.2^{a}	20.4±0.2^{d}	11.3±0.2^{b}	45.6±0.1^{c}	43.1±0.1^{a}
	4 hr	11.1±0.2^{b}	53.5±0.2^{b}	35.4±0.0^{a}	11.0±0.0^{a}	62.5±0.0^{b}	26.5±0.0^{a}	11.2±0.3^{bc}	49.0±0.3^{b}	39.8±0.0^{c}
	5 hr	10.9±0.2^{b}	54.9±0.0^{a}	34.2±0.2^{c}	11.4±0.5^{a}	62.8±0.6^{b}	25.8±0.1^{b}	10.7±0.1^{c}	51.0±0.2^{a}	38.3±0.4^{d}

All values represent mean±SD of duplicate determinations (n=2).
[1)]Molar ratio (fully hydrogenated soybean oil : oleic ethyl ester).
[2)]Final product.
[a-e]Means within the same column without a common letter are significantly different at $P<0.05$ by Duncan's multiple range test.

acid가 주요 지방산으로 분석되었다. 또한 반응물을 구성하는 TAG의 총 지방산 조성과 sn-2 위치의 지방산 조성 모두 반응시간이 증가함에 따라 oleic acid가 증가하는 경향을 보였다. 반응시간의 증가에 따른 sn-2 위치의 oleic acid 증가는 TAG의 sn-1,3 위치와 sn-2 위치에서 지방산이 가역적으로 이동하는 현상인 acyl migration으로 인한 것으로 판단된다. 이러한 acyl migration 현상은 온도, 반응시간, 수분함량, 수분활성도가 높을수록 증가하는 것으로 알려져 있으며 반응기의 종류 등에 의해서도 영향을 받는 것으로 보고되고 있다(18). 이상의 결과를 종합해 본 결과, 기질의 몰 비율이 1:1(FHSBO : OEE, w/w), 반응시간이 2, 3, 4, 5시간일 때, 반응물의 총 지방산 조성은 stearic acid 58.5~61.2 area%와 oleic acid 26.2~29.1 area%의 범위로 나타나 stearic acid가 oleic acid의 두 배 가량 높게 확인되었으며, sn-2 위치에서 지방산 조성은 stearic acid 69.1~78.4 area%와 oleic acid 13.3~19.4 area%로 나타나 비교적 높은 SSO의 조성을 예측할 수 있었다. 따라서 본 합성 조건으로 대량 합성한 후 분별을 진행하였다.

Scaled-up 효소적 합성 및 분별을 통한 최종 생성물의 위치별 지방산 조성

반응 조건 screening을 통한 대량 합성과 용매 분별 및 silica gel column을 통한 정제과정을 거쳐 최종적으로 생성된 비대칭 유지의 지방산 조성 분석결과는 Table 1에 나타내었다. 최종 생성물의 주요 지방산 조성은 10.9~12.9 area% 범위의 palmitic acid(C16:0), 52.2~54.9 area% 범위의 stearic acid(C18:0), 34.2~35.5 area% 범위의 oleic acid(C18:1)로 나타났다. Sn-2 위치의 주요 지방산 조성 또한 C16:0(10.7~11.4 area%), C18:0(62.5~68.4 area%), C18:1(20.4~26.5 area%)로 나타났고, sn-1,3 위치의 지방산 조성은 C16:0(10.7~14.0 area%), C18:0(44.2~51.0 area%), C18:1(38.3~43.1 area%)로 측정되었다. 특히 sn-2 위치의 stearic acid 조성은 반응시간 2, 3, 4, 5시간에서 각각 68.1, 68.4, 62.5, 62.8 area%로 나타나 반응시간 2시간과 3시간에 가장 높은 값을 나타내어 가장 많은 함량의 비대칭 유지인 SSO를 가질 것으로 생각된다.

RP-HPLC를 이용한 TAG 조성 분석

대두극도경화유와 oleic ethyl ester의 효소적 inter-esterification을 통해 생성된 반응물의 분별과정에 따른 TAG 조성의 변화를 RP-HPLC를 이용하여 분석한 결과는 Table 2와 같다. TAG를 구성하는 3개의 지방산의 길이 및 불포화도에 따라 PN으로 분리하여 분석하였으며, 합성된 재구성 지질의 TAG 조성은 PN 48~54의 범위에 분포되어 있음을 확인하였다. 각 분별과정이 진행될수록 전체적으로 PN=48과 50의 TAG 조성은 감소하였으나 PN=52의 TAG 조성은 증가하는 경향을 나타내어 최종적으로 SSO/SOS 조성이 82.31 area%인 반응물을 얻을 수 있었다. 4차례 반복된 SOO/OSO fractionation 수행결과, PN=48의 OOO, POO/OPO, PPO/POP와 PN=50의 SOO/OSO, PSO/POS의 area%가 감소하는 경향을 보였다. 그중 SOO/OSO의 경우, SOO/OSO fractionation 시행 전 15.15 area%를 나타내었으나 분별을 반복할수록 9.23, 4.82, 2.79, 1.91 area%로 나타나, 분별 전에 대하여 87.4%의 SOO/OSO가 제거된 것으로 분석되었다. 한편 PN=48과 PN=50의 TAG의 감소로 인하여 상대적으로 PN=52의 SSO/SOS와 SSP/SPS의 area%는 다소 증가하는 경향을 보였다. 특히 SSO/SOS의 경우, SOO/OSO fractionation 시행 전 65.32 area%를 나타내었으나 분별이 진행될수록 72.35, 78.46, 81.59, 83.17 area%로 나타나 분별 전보다 SSO/SOS가 27.3% 증가되었다. 이후 MAG와 DAG의 함량을 감소시키기 위하여 진행한 silica gel column을 통하여 상대적으로 높은 melting point

Table 2. Triacylglycerol (TAG) species of reactant using reversed-phase HPLC (Unit: area%)

PN[1]	Species[2]	FHSBO[3]:OEE[4]=1:1[5], reaction time=2 hr						
		SOO fractionation					Silica gel column	High melting TAG fractionation (final product)
		Before	1st	2nd	3rd	4th		
48	OOO	0.28	0.15	0.06	0.04	ND[6]	ND	ND
	POO/OPO	1.78	0.95	0.40	0.21	0.09	0.07	0.11
	PPO/POP	0.67	0.62	0.36	0.35	0.25	0.18	0.19
50	SOO/OSO	15.15	9.23	4.82	2.79	1.91	1.81	2.58
	PSO/POS	16.32	16.20	15.18	13.95	13.72	11.59	14.51
	PPS/PSP	0.28	0.29	0.27	0.29	0.26	0.47	0.15
52	SSO/SOS	65.32	72.35	78.46	81.59	83.17	84.57	82.31
	SSP/SPS	0.09	0.07	0.35	0.67	0.47	1.08	0.07
54	SSS	0.09	0.13	0.11	0.13	0.12	0.23	0.07

[1]PN: partition number=total carbon number (CN)－2[total number of double bonds (ND)].
[2]Species: O=oleic acid, P=palmitic acid, S=stearic acid.
[3]FHSBO: fully hydrogenated soybean oil.
[4]OEE: oleic ethyl ester.
[5]Molar ratio.
[6]ND: not detected.

를 가지는 PPS/PSP, SSP/SPS, SSS와 같은 TAG 조성이 각각 0.26, 0.47, 0.12 area%에서 0.47, 1.08, 0.23 area%로 증가하는 변화를 보였다. 따라서 이후 18°C에서 진행한 acetone fractionation을 통하여 각각 0.15, 0.07, 0.07 area%로 감소된 PPS/PSP, SSP/SPS, SSS의 TAG 조성을 가진 최종 생성물을 얻을 수 있었다. 최종 생성물의 TAG 조성은 SSO/SOS와 PSO/POS가 82.31, 14.51 area%로 주로 구성되어 있는 것으로 확인되었다.

RP-HPLC/APCI-MS를 이용한 TAG 이성질체 분석

RP-HPLC는 TAG 조성을 분석함에 있어 보편적으로 사용되고 있으나, 상대적인 retention times에 의존하여 복잡한 혼합물의 TAG 조성 분석에는 실용성이 떨어진다는 단점이 있다. 하지만 mass spectrometer(MS)는 TAG 분자의 종에 따른 지방산 조성과 분자량을 분석할 수 있다는 장점으로 널리 사용되고 있다(14). 따라서 대량 합성 및 분별을 통한 최종 생성물의 TAG 이성질체를 분석하기 위하여 RP-HPLC/APCI-MS를 사용하였으며, 그 결과는 Fig. 1과 같다. 최종 생성물의 PN=50 TAG(SOO/OSO, PSO/POS)의 ion spectrum은 $[PO]^+$ 577.5 m/z, $[PS]^+$ 579.5 m/z, $[OO]^+$ 603.5 m/z, $[SO]^+$ 605.5 m/z에서 확인되었으며, PN=52 TAG인 SSO/SOS의 ion spectrum은 $[SO]^+$ 605.7 m/z, $[SS]^+$ 607.7 m/z에서 확인되었다. 한편 SSO의 함량이 높을 것으로 예상되는 최종 생성물과 SOS의 함량이 높을 것으로 예상되는 코코아버터의 $[SS]^+$: $[SO]^+$의 비율을 Table 3에 나타내었다. Mottram과 Evershed(19)의 연구에 따르면, AAB형태와 ABA형태의 TAG 이성질체는 $[AA]^+$ 이온과 $[AB]^+$이온의 비율로 알아볼 수 있다고 하였는데, 이는 AAB 이성질체에서 생성되는 $[AB]^+$이온보다 ABA 이성질체로부터 $[AB]^+$이온이 쉽게 생성되기 때문인 것으로 해석하였다. 또한 AAB형태의 TAG의 $[AA]^+$: $[AB]^+$의 값은 1에 가깝게 측정되었으며 ABA형태의 TAG는 AAB형태의 TAG보다 그 값이 낮게 나타났다고 보고하였다. 즉 주로 대칭형 TAG(POP, POS, SOS)로 구성된 코코아버터의 $[SS]^+$: $[SO]^+$의 비율이 0.37로 분석된 것에 비하여 최종 생성물의 $[SS]^+$: $[SO]^+$의 비율은 0.54로 분석된 것으로 보아 최종 생성물은 코코아버터에 비해 비대칭형인 TAG의 함량이 높으며, 따라서 대칭형 TAG인 SOS와 비대칭형 TAG인 SSO가 함께 공존하여 존재하는 것으로 예측할 수 있었다(Table 3).

DSC를 통한 흡열 및 발열곡선 분석

반응에 사용된 기질인 대두극도경화유(FHSBO)와 코코아버터, 그리고 분별과정에 따른 반응물의 흡열곡선 및 발열곡선을 분석한 결과는 Fig. 2와 같다. 상온에서 고체인 대두극도경화유의 흡열곡선(Fig. 2(A), a)은 64.1°C와 69.2°C에서 피크를 보여 높은 융점을 나타내었으며, 발열곡선(Fig. 2(B), a)은 41.7°C에서 피크를 나타내었다. 한편 분별로 인

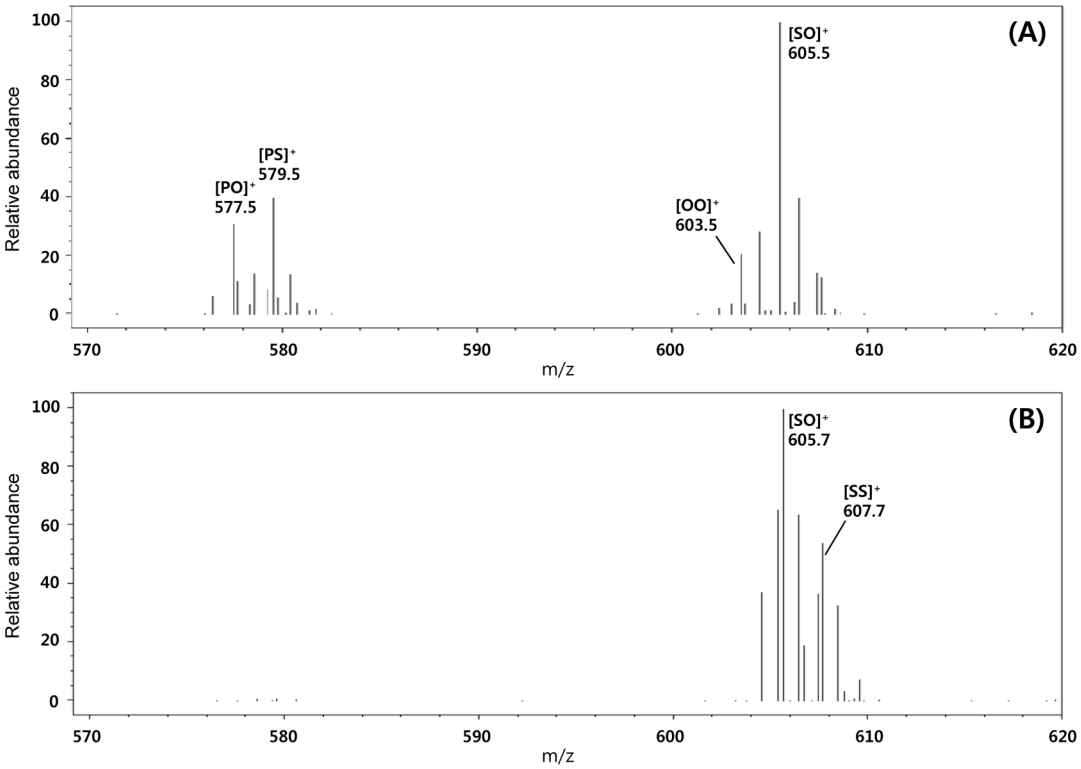

Fig. 1. The APCI mass spectrum of PN=50 TAG (SOO/OSO, PSO/POS; A) and PN=52 TAG (SSO/SOS; B) in final product (FHSBO[1] : OEE[2]=1:1[3]), reaction time=5 hr). [1]FHSBO: fully hydrogenated soybean oil. [2]OEE: oleic ethyl ester. [3]Molar ratio.

Table 3. Relative abundances of $[SS]^+$ and $[SO]^+$ ions in cocoa butter (SOS type triacylglycerol) and final product (SSO type triacylglycerol; FHSBO[1] : OEE[2]=1:1[3], reaction time=5 hr)

	Final product (SSO+SOS triacylglycerol)	Cocoa butter (High SOS triacylglycerol)
$[SS]^+$	54	37
$[SO]^+$	100	100
$[SS]^+ : [SO]^+$	0.54	0.37

[1]FHSBO: fully hydrogenated soybean oil.
[2]OEE: oleic ethyl ester.
[3]Molar ratio.

하여 상대적으로 융점이 높은 TAG와 MAG, DAG가 제거되면서, 각 분별과정에 따른 반응물의 melting 및 crystallization behavior가 흡열 피크는 융점이 낮은 쪽으로, 발열 피크는 어는점이 낮은 쪽으로 점차 이동하는 경향을 보였다. 먼저 SOO/OSO fractionation을 마친 반응물(Fig. 2, b)의 흡열 곡선은 1.3, 9.1, 29.7, 40.4, 56.5°C에서, 발열 곡선은 2.7, 20.4, 26.9, 32.5°C에서 peak를 나타내어 비교적 넓은 온도 범위에서 peak가 확인되었다. 이에 반하여 silica gel column을 통과한 후의 반응물(Fig. 2, c)은 융점의 경우 1.9, 9.5, 30.3, 41.2°C로 나타났으며, 결정화점은 2.8, 19.5°C로 나타나 온도 범위가 다소 좁혀진 것으로 분석되었다. 이와 같은 결과는 silica gel column을 통해 상대적으로 높은 융점을 가지는 MAG와 DAG의 함량이 감소함으로써 일어난 것으로 생각된다. 그 후 18°C에서 진행된 acetone fractionation으로 얻어진 최종 생성물(Fig. 2, d)의 융점 및 결정화점은 각각 1.2, 9.6, 28.7°C와 2.3, 17.6°C로 측정되었으며, 코코아버터(Fig. 2, e)의 융점 및 결정화점은 각각 23.7°C와 8.8°C에서 측정되어 코코아버터보다 최종 생성물의 융점 및 결정화점이 조금 높게 측정되었으나 비교적 유사한 온도 범위로 나타난 것으로 생각된다.

Solid fat index(SFI) 및 slip melting point 분석

효소적 반응 및 분별을 통해 얻은 최종 생성물과 코코아버터의 solid fat index(SFI)와 slip melting point를 나타낸 결과는 Table 4와 같다. SFI는 고체지의 solid 함량을 측정하는 방법으로써, 유지(fats and oils) 관련 산업에서 제품의 품질특성을 측정하는데 중요한 지표로 사용되고 있다(20). 코코아버터 대체지로서 필요한 SFI pattern은 30°C에서 36 또는 37°C의 범위에서 0이나 0에 가까운 값을 나타내야 하는 것으로 알려져 있다(9). 분석 결과, 30°C~38°C의 범위에서 코코아버터의 SFI는 1.27(30°C), 0.02(36°C), 0.00(38°C)로 측정되었으나, 높은 SSO 조성으로 예측되는 최종 생성물의 SFI는 9.57(30°C), 0.25(36°C), 0.07(38°C)로 나타나 해당 온도 범위에서 코코아버터에 비하여 고체지 함량이 다소 높게 나타났다. 최종 생성물이 코코아버터보다 다소

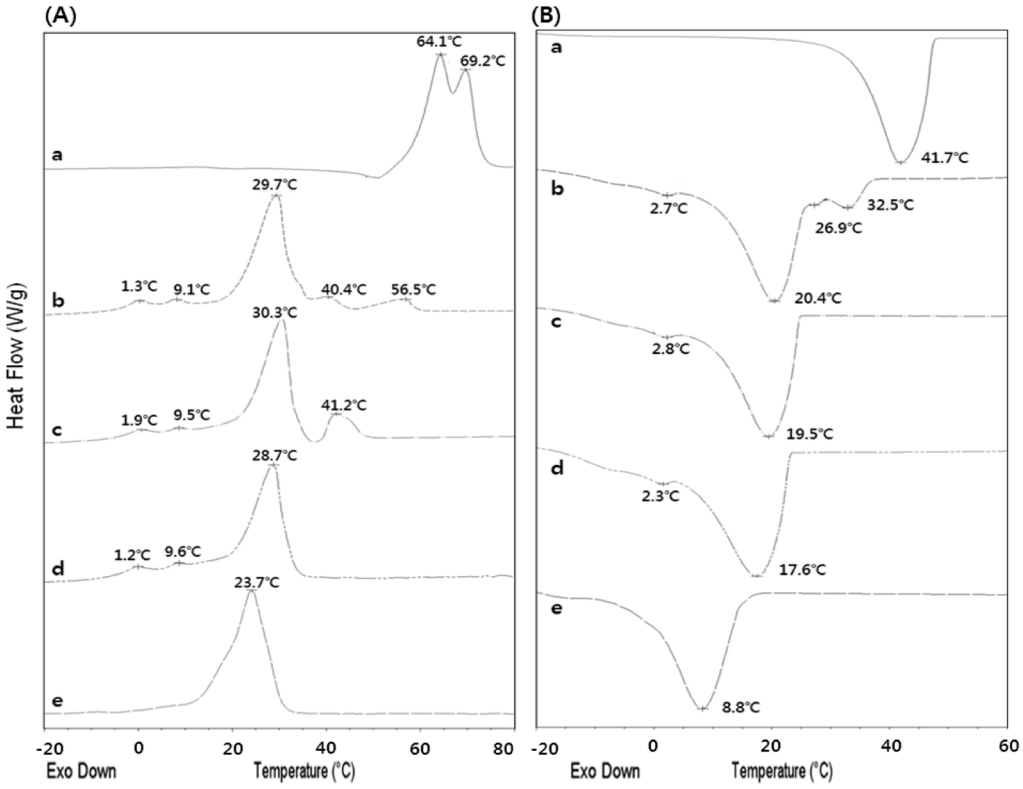

Fig. 2. Melting curves (A) and crystallization curves (B) of fully hydrogenated soybean oil (FHSBO; a), cocoa butter (CB; e) and reactant (FHSBO : OEE=1:1[1], reaction time=2 hr) from each fractionation steps (b: after SOO/OSO fractionation, c: after silica gel column, d: final product) by differential scanning calorimetry (DSC). [1]Molar ratio.

Table 4. Solid fat index (%) of cocoa butter and final product (FHSBO[1)] : OEE[2)]=1:1[3)], reaction time=2 hr) obtained from differential scanning calorimetry

Temp. (°C)	Cocoa butter	Final product
0	98.09	95.06
10	92.81	84.06
20	65.08	68.70
22	50.71	63.56
24	31.59	55.47
26	15.52	42.82
28	5.35	25.48
30	1.27	9.57
32	0.31	2.64
34	0.09	0.73
36	0.02	0.25
38	0.00	0.07
40	0.00	0.00
Slip M.P (°C)	23	29.5

[1)]FHSBO: fully hydrogenated soybean oil.
[2)]OEE: oleic ethyl ester.
[3)]Molar ratio.

높은 온도에서 완전하게 녹는 결과는 Quast 등(21)의 연구에서 코코아버터와 pure CBR이 각각 35°C, 38°C 내외의 온도에서 완전히 녹는 것과 유사하게 나타났다. 또한 전반적으로 같은 온도에서 코코아버터보다 최종 생성물의 고체지 함량이 높게 분석되었는데, 이는 융점이 높은 stearic acid (C18:0)의 함량이 코코아버터보다 최종 생성물이 높기 때문인 것으로 판단된다. 이로 인하여 코코아버터와 최종 생성물의 slip melting point 또한 각각 23°C, 29.5°C로 분석되어 최종 생성물이 코코아버터보다 높게 측정된 것으로 판단된다.

요 약

본 연구는 대두극도경화유(fully hydrogenated soybean oil, FHSBO)와 oleic ethyl ester를 사용하여 코코아버터 대체유지(CBR)로서 사용가능한 비대칭 유지를 개발하고자 하였다. 생산된 비대칭 유지는 위치별 지방산 및 TAG 조성 분석, 흡열 및 발열곡선 분석을 수행하여 특성연구를 진행하였으며, TAG 이성질체 분석과 solid fat index(SFI), slip melting point 측정 결과는 코코아버터와 비교 분석하였다. 위치별 지방산 및 TAG 조성 분석 결과, 최종적으로 생산된 비대칭 유지의 주요 TAG 조성은 SSO/SOS, PSO/POS로 분석되었으며 sn-2 위치의 지방산은 62.5~68.4 area%의 범위로 주로 stearic acid로 구성되어 있음을 확인하였다. 이는 최종 생성물의 TAG 조성이 SOS, POS보다 주로 SSO, PSO와 같은 비대칭형 TAG로 구성되어 있음을 나타내는 결과인 것으로 생각된다. 또한 RP-HPLC/APCI-MS를 이용하여 SSO와 SOS의 TAG 이성질체 분석한 결과, $[SS]^+$: $[SO]^+$의 비율이 0.54로 분석된 최종 생성물은 0.37로 분석된 코코아버터에 비하여 비대칭형 TAG인 SSO의 함량이 높으나, 대칭형 TAG인 SOS와 함께 공존하여 존재하는 것으로 나타났다. 코코아버터와 최종 생성물 모두 30~35°C의 온도 구간에서 급격한 흡열곡선을 나타내어 코코아버터 대체유지로서의 특성을 가지고 있었으나, 최종 생성물은 코코아버터보다 조금 높은 SFI와 slip melting point를 가지는 것으로 분석되었다. 이는 최종 생성물의 stearic acid 함량이 코코아버터보다 높은 것에 기인된 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 2013년 미래창조과학부의 방사선기술개발사업 재원으로 지원(한국원자력연구원 2012M2A2A6011335)을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Lipp M, Simoneau C, Ulberth F, Anklam E, Crews C, Brereton P, de Greyt W, Schwack W, Wiedmaier C. 2001. Composition of genuine cocoa butter and cocoa butter equivalents. *J Food Compos Anal* 14: 399-408.
2. Lonchampt P, Hartel RW. 2004. Fat bloom in chocolate and compound coatings. *Eur J Lipid Sci Technol* 106: 241-274.
3. Amoye S. 2006. Cocoa sourcing, world economics and supply. *The Manufacturing Confectioner* 86: 81-85.
4. Lipp M, Anklam E. 1998. Review of cocoa butter and alternative fats for use in chocolate-part A. Compositional data. *Food Chem* 62: 73-97.
5. Ciftci ON, Fadiloglu S, Kowalski B, Gogus F. 2008. Synthesis of cocoa butter triacylglycerols using a model acidolysis system. *Grasas Y Aceites* 59: 316-320.
6. Bootello MA, Hartel RW, Levin M, Martinez-blanes JM, Real C, Garces R, Martinez-force E, Salas JJ. 2013. Studies of isothermal crystallisation kinetics of sunflower hard stearin-based confectionery fats. *Food Chem* 139: 184-195.
7. Abigor RD, Marmer WN, Foglia TA, Jones KC, DiCiccio RJ, Ashby R, Uadia PO. 2003. Production of cocoa butter-like fats by the lipase-catalyzed interesterification of palm oil and hydrogenated soybean oil. *J Am Oil Chem Soc* 80: 1193-1196.
8. Chong CN, Hoh YM, Wang CW. 1992. Fractionation procedures for obtaining cocoa butter-like fat from enzymatically interesterified palm olein. *J Am Oil Chem Soc* 69: 137-140.
9. Baliga BP, Shitole AD. 1981. Cocoa butter substitutes from mango fat. *J Am Oil Chem Soc* 58: 110-114.
10. Kim JY, Lee KT. 2009. Characterization of scaled-up low-trans shortening from rice bran oil and high oleic sunflower seed oil with batch type reactor. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 338-345.
11. Lee KT, Akoh CC. 1996. Immobilized lipase-catalyzed production of structured lipids with eicosapentaenoic acid at specific positions. *J Am Oil Chem Soc* 73: 611-615.
12. 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.
13. Moon JH, Hwang YI, Lee KT. 2009. Study on the positional distribution of fatty acids, and triacylglycerol separation, of seed oils. *Korean J Food Preserv* 16: 726-733.
14. Mottram HR, Woodbury SE, Evershed RP. 1997. Identification of triacylglycerol positional isomers present in vegeta-

ble oils by high performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 11: 1240-1252.
15. Md.Ali AR, Dimick PS. 1994. Thermal analysis of palm mid-fraction, cocoa butter and milk fat blends by differential scanning calorimetry. *J Am Oil Chem Soc* 71: 299-302.
16. AOCS. 1990. *Official Methods and Recommended Practices*. 4th ed. American Oil Chemists' Society, Champaign, IL, USA. Cc 4-25.
17. Laszlo JA, Compton DL, Vermillion KE. 2008. Acyl migration kinetics of vegetable oil 1,2-diacylglycerols. *J Am Oil Chem Soc* 85: 307-312.
18. Xu X. 2000. Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed reactions: a review. *Eur J Lipid Sci Technol* 102: 287-303.
19. Mottram HR, Evershed RP. 1996. Structure analysis of triacylglycerol positional isomers using atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry. *Tetrahedron Lett* 37: 8593-8596.
20. Mills BL, van de Voort FR. 1981. Determination of solid fat index of fats and oils using the anton paar density meter. *J Am Oil Chem Soc* 58: 618-621.
21. Quast LB, Luccas V, Ribeiro APB, Cardoso LP, Kieckbusch TG. 2013. Physical properties of tempered mixtures of cocoa butter, CBR and CBS fats. *Int J Food Sci Technol* 48: 1579-1588.