

## 효소적 Acidolysis를 이용한 Stearic Acid 함유 팜중부유의 개질

전미선<sup>1</sup> · 이윤정<sup>1</sup> · 강지현<sup>2</sup> · 이정희<sup>3</sup> · 이기택<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>충남대학교 식품공학과

<sup>2</sup>씨제이제일제당(주) 식품연구소

<sup>3</sup>충남대학교 농업과학연구소

### Modification of Palm Mid Fraction with Stearic Acid by Enzymatic Acidolysis Reaction

Mi-Sun Jeon<sup>1</sup>, Yun-Jeung Lee<sup>1</sup>, Ji-Hyun Kang<sup>2</sup>, Jeung-Hee Lee<sup>3</sup>, and Ki-Teak Lee<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Food Science and Technology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

<sup>2</sup>Food R&D CJ Cheiljedang Corporation, Seoul 152-050, Korea

<sup>3</sup>Institute of Agricultural Science, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

#### Abstract

The acidolysis was performed to produce structured lipid with palm mid fraction (PMF) and stearic acid for 7, 24, and 36 hr at 70°C. The reaction was catalyzed by lipozyme TLIM (immobilized lipase from *Thermomyces lanuginosa*, amount of 10% and 20% by weight of total substrates) in the shaking water bath. The reaction conditions for maximum incorporation of stearic acid on the structured lipid were obtained when molar ratio of PMF and stearic acid was 1:2; concentration of lipozyme TLIM was 20wt%; reaction temperature was 70°C; and reaction time was 36 hr. After reaction under this condition, incorporation of stearic acid in the structured lipid was obtained up to 36.3% while the major components of triacylglycerol were 1,2-dipalmitoyl-3-stearoylglycerol (PPS, 28.19 area%), 1-palmitoyl-2-oleoyl-3-stearoylglycerol (POS/PSO, 20.70 area%) and 1-palmitoyl-2,3-distearoylglycerol (PSS, 18.13 area%). However, the fatty acid composition at the sn-2 position suggested that the positional specificity of lipozyme TLIM was not observed due to the acyl migration.

**Key words:** palm mid fraction, stearic acid, acidolysis, lipozyme TLIM, acyl migration

#### 서 론

재구성지질(structured lipids)이란 유지의 공업적, 영양학적 특성을 개선하기 위해 글리세롤에 결합되어 있는 지방산의 조성이나 지방산의 위치(regiospecific position)를 변화시켜 생성된 유지를 말한다(1). 재구성 지질은 화학적 또는 효소적 반응으로 생성될 수 있는데, 화학적 반응은 에너지의 소비가 크고 부반응이 많이 생기는 단점이 있어 근래에는 효소적 반응에 대한 관심이 증가하고 있다(2,3). 효소를 이용한 반응은 반응 시 사용되는 에너지의 양이 적으며 최종 생성물의 손실도 적고 고정화 효소를 이용 시 효소의 재이용이 가능하여 경제적인 측면도 가졌다. 특히 효소는 위치 특이성의 성질을 가지고 있어 합성하고자 하는 product를 효율적으로 생산할 수 있는 장점을 가지고 있다(4).

어떠한 지방효소(lipase)는 물이 임계치 이상 존재할 경우 유지를 가수분해하지만, 그렇지 않을 경우엔 에스테르교환반응(transesterification)을 한다. 에스테르교환반응 중

acidolysis 반응은 triacylglycerol(TAG)의 glycerol의 back bone에 fatty acid의 acyl기가 결합되는 것이다. 특히, 효소적 acidolysis 반응은 위치 특이성을 가진 lipase으로부터 TAG의 에스테르 결합을 가수분해한 후, 다시 특이 위치에 fatty acid가 결합될 수 있다. 위치특이성을 가진 효소를 이용하여 acidolysis 반응을 통해 옥수수유 또는 대두유에 기능성 지방산인 conjugated linoleic acid를 결합시켜 기능성 유지를 합성한 연구가 보고되었다(5,6).

현재 상업적으로 사용되고 있는 sn-1,3 position에 위치특이성을 가진 효소의 예는 *Thermomyces lanuginosa lipase*로부터 유래한 lipozyme TLIM, *Rhizomucor miehei lipase*로부터 유래한 lipozyme RMIM, *Rhizopus oryzae lipase*로부터 유래한 lipase F-AB15 등이 있다(7). 하지만 이러한 효소적 반응은 sn-1,3 position에 특이적으로 작용하는 장점이 있는 반면, 여러 반응조건에 의해 acyl migration 현상이 일어나 부가생성물이 생성될 수 있다는 것이 알려졌다. Acyl migration 현상은 acyl기가 sn-1(3) position에서 sn-2 posi-

\*Corresponding author. E-mail: ktleee@cnu.ac.kr  
Phone: 82-42-821-6729, Fax: 82-42-822-6729

tion으로 이동하거나, sn-2 position에서 sn-1(3) position으로 이동하는 현상을 말한다. Xu 등(8)에 따르면 반응온도가 높고, 반응시간이 길며, 효소량이 많을수록 acyl migration 현상이 증가하게 된다고 보고하였다. 특히 acyl migration 현상에 영향을 주는 가장 큰 요인은 온도라고 보고하였고 효소를 이용하여 에스테르교환반응 시에 최적온도가 50~70°C이기 때문에 acyl migration 현상을 완전히 제거하는 것은 불가능하다고 보고되었다(9). 따라서 온도를 낮추어 acyl migration 현상을 감소화 하는 연구가 보고되고 있다(10-12).

한편, palm oil은 35~40%의 1,3-dipalmitoyl-2-oleoyl-glycerol(POP)를 함유하고 있으며 이것을 유지의 분별과정(fractionation)을 거쳐 POP가 70~80% 함유된 palm mid fraction(PMF)을 생산할 수 있다. Palm mid fraction(PMF)은 다른 유지와 blending을 거쳐 cocoa butter equivalent(CBE) 생산에 이용되기도 한다(13). 또한 Bloomer 등(14)은 fractionation을 한 palm oil을 이용하여 다양한 효소에 따른 cocoa butter equivalent(CBE) 합성반응 조건에 대해 발표하였다.

본 연구는 대부분이 POP로 구성된 PMF에 stearic acid를 1,3-position에 특이적으로 작용하는 고정화 효소 lipozyme TLIM을 이용하여 acidolysis 반응을 통해 stearyl기의 함량이 높은 팜중부유로 개질을 하고자 하였다. 개질을 통하여 얻을 수 있는 TAG형태는 주로 palmitic acid, oleic acid, stearic acid로 구성되어 있는 TAG로써 이들 acyl기로 구성되어진 TAG들은 용점이 인체의 온도와 유사한 범위를 가지고 있어서 confectionary 또는 화장품 등에 유용하게 사용될 수 있다. 개질 후 stearyl기가 포함된 TAG의 구성성분인 1-palmitoyl-2-oleoyl-3-stearoylglycerol(POS), 1-palmitoyl-2-stearoyl-3-oleoylglycerol(PSO), 1,2-dipalmitoyl-3-stearoylglycerol(PPS), 1,3-distearoyl-2-oleoylglycerol(SOS), 1,2-distearoyl-3-oleoylglycerol(SSO), 1-palmitoyl-2,3-distearoylglycerol(PSS), tristearoylglycerol(SSS) 등의 함량변화를 gas chromatograph(GC)와 reversed-phase high performance liquid chromatography(RP-HPLC)를 통해 살펴보았다.

## 재료 및 방법

### 재료

본 실험에 사용된 palm mid fraction 34(PMF, Nisshin OilliO group Ltd., Tokyo, Japan)는 C사에서 제공받았으며 stearic acid(95%)는 Sigma Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 반응에 사용한 효소는 lipozyme TLIM으로 *Thermomyces lauginosus*로부터 획득한 lipase를 silica gel에 고정화시킨 것으로써 Novozymes North America Inc.(Franklinton, NC, USA)의 제품을 사용하였다.

### 재구성 지질의 합성

기질의 몰 비율에 따른 결합율을 알아보기 위하여 PMF와 stearic acid를 1:0.5, 1:1, 1:1.5 그리고 1:2의 몰 비율로 반응하였다. PMF와 stearic acid의 몰 비율이 1:0.5일 경우 PMF 25 g, stearic acid 4.3 g을 혼합한 기질과 기질 총량의 10%와 20%에 해당하는 lipozyme TLIM(Aw<0.1) 2.9 g과 5.9 g 각각을 screw cap이 장착된 삼각플라스크에 넣고 반응하였다. 반응시간은 24 hr, 반응온도는 70°C이었으며, 180 rpm으로 항온교반수조에서 수행하였다. 반응시간에 따른 반응율을 확인하기 위하여 동일한 조건 하에 총 기질무게의 lipozyme TLIM을 20%를 첨가하여 PMF와 stearic acid의 몰 비율 1:0.5, 1:1, 1:1.5, 1:2 반응 각각의 7, 24, 36 hr의 반응물을 취하였다.

### 지방산 조성 분석

재구성 지질 중 triacylglycerol(TAG)의 지방산 조성을 위해 thin layer chromatography(TLC) 및 gas chromatography(GC) 분석을 시행하였다. 시료 50 µL을 1 mL의 hexane(HPLC grade)에 용해시켜 hexane, diethylether, acetic acid 50:50:1 비율의 부피비 전개용매를 이용하여 TLC silica plate(20×20 cm, Merck KGaA, Darmstadt, Germany)에 전개하였다. 분리된 TAG band를 채취하여 GC분석을 위해 methylation을 실시하였다. Methylation 방법은 식품의약품안전청에서 고시한 식품등 중 기준규격미설정물질의 시험방법을 참고하여 실시하였다(15). 채취한 TAG band를 test tube에 넣고, 1.5 mL의 0.5 N methanolic NaOH를 첨가하였다. 100°C의 항온수조에서 5분간 반응 후 30~40°C에서 냉각시키고, 이에 2 mL의 BF<sub>3</sub>-methanol 을 첨가 후 100°C의 항온수조에서 2분간 반응하였다. 30~40°C에서 충분히 냉각시킨 시료에 1~2 mL의 iso-ocatane과 포화 NaCl 용액을 첨가 후 약 1분간 진탕 후 5분간 방치하였다. 분리된 상층액을 취하여 sodium sulfate anhydrous column으로 수분과 이물질을 제거 후 1 µL를 GC에 주입하였다. 분석 장치는 flame-ionization detector(FID)와 auto sampler가 장착된 Hewlett-Packard 6890 series GC(Anondale, PA, USA)를 사용하였다. Column은 SP-2560(100 m×0.25 mm×0.2 µm film thickness, Bellefonte, PA, USA)으로 inject 온도는 250°C, detector 온도는 280°C로 설정하였다. Oven 온도는 180°C에서 40분간 유지 후 3°C/min으로 상온시켜 230°C까지 도달하여 230°C에서 10분간 유지하였다. Split ratio는 1/50, gas flow는 1 mL/min로 유지하였다. 이러한 조건으로 분석하여 얻은 지방산 메틸에스테르들의 peak는 표준물질 Nu Check 461의 머무름 시간과 비교하여 동정하였다. 지방산의 wt%를 구하기 위하여 다음 계산식을 사용하였으며 FID 전환계수와 지방산 메틸에스테르로부터의 지방산 전환계수는 식약청에서 고시한 방법(15)에 의해 산출하였다.

$$FA_i \text{ (g/100 g 지방산)} = \frac{P_i \times f_i}{R_i} \times \frac{100}{\sum (P_j \times f_j / R_j)}$$

$P_i, P_j$ : 지방산 피크면적

$R_i, R_j$ : 각 지방산 표준물질에서 구한 FID 전환계수

$f_i, f_j$ : 각 지방산 메틸에스테르로부터 지방산으로의 전환계수

**지방산의 위치별 조성 분석**

재구성 지질 중의 sn-2 및 sn-1,3 위치의 지방산 조성 분석을 위하여 pancreatic lipase(from hog pancreas, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)에 의한 분석을 실행하였다. 약 7 mg의 시료에 7 mL의 1 M Tris-HCl buffer(pH 7.6), 1.75 mL의 0.05% 담즙산염, 0.7 mL의 2.2% CaCl<sub>2</sub>을 첨가한 후 시료의 양과 동일한 양의 pancreatic lipase을 첨가하였다. 그 후 37°C 항온수조에서 3분간 반응 후 1분 동안 충분히 교반하였고 이와 같은 과정을 3~4회 반복하였다. 반응이 끝난 시료에 2 mL의 diethyl ether 첨가한 후 진탕하여 위층만 분리하여 sodium sulfate anhydrous column을 이용하여 수분 및 불순물을 제거하였다. 이를 n-hexane, diethylether, acetic acid의 50:50:1 비율의 부피비 전개용매를 사용하여 TLC를 통해 R<sub>f</sub> 값이 0.03인 2-monoacylglycerol band를 분리하였다. 이를 methylation 과정을 거친 후 GC 분석을 시행하여 지방산 조성을 알아보았다. Sn-1,3 position의 지방산 조성 계산식은 다음과 같다.

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

**RP-HPLC 분석**

재구성 지질의 TAG 조성을 확인하기 위해 n-hexane, diethylether, acetic acid의 50:50:1 비율의 부피비 전개용매를 이용한 TLC를 통해 R<sub>f</sub> 값이 0.6인 TAG band를 분리한 뒤 RP-HPLC 분석을 시행하였다. 분석기기는 Yonglin SP930D dual pump와 Nova-Pak<sup>(R)</sup> C18 60Å 4 μm(3.9×150 mm I.d., Waters, Milford, Ireland) column을 사용하였다. Sedex 75 evaporative light scattering detector(ELSD, Dedere, Alfortvill, France)로 40°C, 2.2 bar로 설정하였다. 이동상은 기울기용리로써 acetonitrile(solvent A), iso-propanol과 hexane 부피비 80:20 용매(solvent B)를 사용하였으며, 유속은 1 mL/min으로 흘려주었다. 시료 5 mg을 chloroform(HPLC grade) 10 mL에 녹인 희석액을 PTFE syringe filter(0.5 μm, Advantec, Tokyo, Japan)를 이용하여 여과 후 auto sampler를 이용해 10 μL 주입하여 분석하였다. 시료 주입 후 solvent A와 B의 부피비 80:20 비율로 흘리기 시작하여 45분까지 54:46으로 변화시킨 뒤 15분 간 유지시켰다. 다시 60분부터 solvent A와 B의 부피비 54:60에서 65분까지 80:20으로 변화시킨 뒤 70분까지 유지함으로써 분석을 마쳤다. 분석 후 TAG의 partition number(PN)는 다음 계산식을 이용하여 구하였다.

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

**결과 및 고찰**

**Lipozyme TLIM 20 wt% 사용 시 반응시간과 기질의 물 비율에 따른 stearic acid 결합 반응률 비교**

PMF와 stearic acid를 이용해 개질된 팜중부유의 반응 시간과 물 비율에 따른 stearic acid 결합 반응률을 알아보기 위하여 TAG의 지방산 조성을 GC 분석을 통해 알아보았다. 반응온도는 70°C, 180 rpm, lipozyme TLIM은 기질 질량의 20 wt%를 사용하여 반응시간(7, 23, 36 hr)과 기질 물 비율(PMF : stearic acid=1:0.5, 1:1, 1:1.5, 1:2)을 변수로 하여 반응율을 비교 분석하였다(Fig. 1).

전체적으로 반응시간이 지날수록 TAG 중의 stearic acid의 함량은 증가하고 PMF의 주성분인 palmitic acid와 oleic acid의 함량은 감소하는 경향을 보였다. 그 중 1:2의 비율이 가장 큰 변화를 나타내었는데 stearic acid의 경우 약 2배 증가(7 hr: 18.3%, 36 hr: 36.3%)한 반면, palmitic acid의 경우 약 1.3배 감소(7 hr: 47.3%, 36 hr: 37.1%), oleic acid의 경우 약 1.3배 감소(7 hr: 31.5%, 36 hr: 24%)하였다. 가장 높은 변화율을 보인 1:2는, 1:1.5와 비교적 비슷한 함량을 나타내었다. 이로써 효소량 20 wt%를 사용할 경우, 기질에 stearic acid의 함량이 높아질수록 TAG에 결합할 확률이 높아지지만 stearic acid의 함량이 증가함에 따라 비례적으로 증가하는 것은 아님을 알 수 있다. 따라서 최적의 물 비율 이상의 stearic acid의 첨가는 반응에 모두 참여하지 못하고 잉여의 산물로 남아 있을 것으로 예측된다. 이에 반해 1:0.5는 가장 낮은 변화율을 보였다. Stearic acid의 경우 약 1.3배 증가(7 hr: 15.5%, 36 hr: 19.8%)한 반면, palmitic acid의 경우 변화량이 거의 보이지 않았고(7 hr: 48.7%, 36 hr: 48.8%), oleic acid의 경우 약 1.1배 감소(7 hr :32.6%, 36 hr: 28.5%)하였다.

**Lipozyme TLIM 양과 물 비율 따른 stearic acid 결합 반응률 비교**

Lipozyme TLIM을 기질 질량의 10 wt%와 20 wt% 사용하고 PMF와 stearic acid의 물 비율을 1:0.5, 1:1, 1:1.5, 1:2로 하여 stearic acid 결합 반응률을 비교하였다(Table 1). 온도는 70°C, rpm은 180을 유지하게 하여 24 hr에 시료를 채취한 뒤 TLC 상의 TAG부분을 GC분석하였다.

반응 조건 중 stearic acid의 함량이 비교적 높게 나타난 PMF와 stearic acid의 물 비율 1:2를 선정하여 lipozyme TLIM양에 따른 반응률을 비교해 보았다. 그 결과 효소량을 10 wt% 사용할 때보다 20 wt% 사용하였을 경우 stearic acid의 결합은 많게는 약 2.4배 증가하였다. 개질 전 PMF의 stearic acid 함량은 6.1%이었지만(Table 2), 효소량을 20 wt% 사용하여 반응한 경우 stearic acid의 함량은 31.6%까지 증가하였다. 반면, 효소량을 10 wt% 사용하였을 때는 13.4%까지 증가하여 효소량을 20 wt% 사용했을 때보다 약

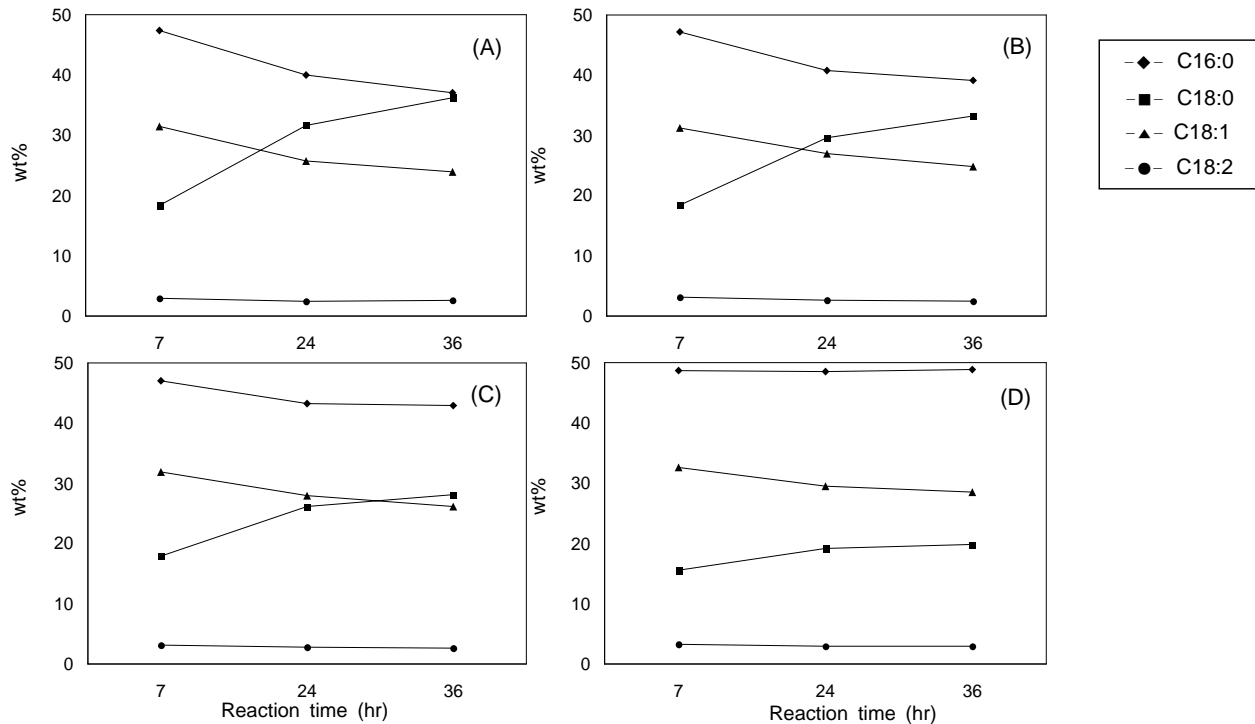


Fig. 1. Change of fatty acid composition at different reaction times. Molar ratio of palm mid fraction (PMF) and stearic acid (SA) (A) 1:2, (B) 1:1.5, (C) 1:1, (D) 1:0.5 with lipozyme TLIM 20 wt% of substrates.

Table 1. Fatty acid composition of products from acidolysis reaction with lipozyme TLIM at 24-hour reaction

(Unit: wt%)

Fatty acid	Lipozyme TLIM 10 wt% <sup>1)</sup>			Lipozyme TLIM 20 wt%				
	1:0.5 <sup>2)</sup>	1:1	1:1.5	1:2	1:0.5	1:1	1:1.5	1:2
C16:0	52.2	50.8	52.4	51.8	48.5	43.2	40.8	40.0
C18:0	13.3	14.9	12.5	13.4	19.1	26.1	29.6	31.6
C18:1	31.4	31.1	32.0	31.7	29.5	27.9	27.0	25.8
C18:2	3.1	3.1	3.1	3.1	2.9	2.8	2.6	2.5

<sup>1)</sup>Lipozyme TLIM wt% based on the substrates amounts.

<sup>2)</sup>Molar ratio of palm mid fraction with stearic acid.

Table 2. Positional fatty acid composition of palm mid fraction (PMF) and stearic acid (SA)

(Unit: area%)

Fatty acid	SA		PMF		Lipozyme TLIM 20 wt% <sup>4)</sup> , PMF : SA = 1:2					
	Total	Total <sup>1)</sup>	sn-2	sn-1,3	7 hr			36 hr		
					Total	sn-2	sn-1,3	Total	sn-2	sn-1,3
C16:0	0.4	57.2	10.5	81.0	47.3	66.6	37.7	37.1	50.1	30.6
C18:0	98.8	6.1	1.3	8.6	18.3	24.0	15.5	36.3	43.7	32.6
C18:1	—	33.4	81.0	9.2	31.5	8.7	42.9	24.0	5.4	33.3
C18:2	0.8	3.3	7.2	1.2	2.9	0.7	4.0	2.6	0.8	3.5
ΣSFA <sup>2)</sup>	99.2	63.3	11.8	89.6	65.6	90.6	53.2	73.4	93.8	63.2
ΣUSFA <sup>3)</sup>	0.8	36.7	88.2	10.4	34.4	9.4	46.9	26.6	6.2	36.8

<sup>1)</sup>Total fatty acid.

<sup>2)</sup>Sum of saturated fatty acids.

<sup>3)</sup>Sum of unsaturated fatty acids.

<sup>4)</sup>Lipozyme TLIM wt% based on the substrates amounts.

2.4배 낮은 함량을 보였다. 개질 전 PMF의 palmitic acid와 oleic acid의 함량은 각각 57.2%, 33.4%이었으나, PMF와 stearic acid의 몰비를 1:2로 acidolysis 반응 후 감소되는 경향을 보였고, 그 감소량은 효소량을 10 wt% 사용하였을 때

보다 20 wt% 사용하였을 경우 더 크게 나타났다. 즉, 개질된 PMF의 palmitic acid 함량은 효소량을 10 wt% 사용하였을 때, 개질 전 PMF보다 5.4% 감소한 반면, 효소량을 20 wt% 사용하였을 경우 개질 전보다 17.2% 감소하였다. 또한 oleic

acid의 함량도 효소량을 10 wt% 사용하였을 경우, 개질 전 PMF보다 1.7% 감소한 반면, 효소량을 20 wt% 사용하였을 경우 7.6% 감소하였다(Table 1, 2).

한편, Table 1에서 효소량 10 wt%와 20 wt% 사용 시 몰 비율에 따른 stearic acid 결합 반응물(24 hr)을 비교해 보았다. Lipozyme TLIM을 10 wt% 사용하였을 경우, PMF와 stearic acid의 몰 비율이 각각 1:0.5, 1:1, 1:1.5, 1:2일 때 몰 비율 간의 stearic acid, palmitic acid, oleic acid의 함량이 뚜렷한 차이를 보이지 않으면서 개질 전 PMF의 stearic acid 함량보다는 6.4~8.8% 증가함을 보였다. 반면 lipozyme TLIM을 20 wt% 사용하였을 경우, 몰 비율 간의 stearic acid, palmitic acid, oleic acid의 함량이 뚜렷한 차이를 보였다. 기질에서 stearic acid의 첨가량이 증가할수록 반응물의 stearic acid 함량은 증가하였다. 몰 비율 1:0.5로 24 hr 반응했을 경우 PMF의 stearic acid 함량보다 13% 증가하였고, 몰 비율이 1:2일 경우엔 25.5% 증가하였다. Palmitic acid와 oleic acid는 기질에서 stearic acid의 첨가량이 증가할수록 반응물에서 감소함을 알 수 있었다.

RP-HPLC 분석

반응시간이 증가할수록 TAG 중의 stearic acid의 함량 변화가 가장 크게 나타났던 반응조건은 효소 첨가량 20 wt%, PMF와 stearic acid의 몰 비율 1:2이었다. 이 조건에서 7 hr와 36 hr의 시료를 TLC를 통해 TAG부분을 분리한 뒤 RP-HPLC 분석을 통해 그 조성을 알아보았다(Table 3, Fig. 2). 반응 기질로 사용된 PMF는 대부분이 POP로 93.27

area%를 차지하였다. PMF에 stearic acid를 첨가하여 acidolysis 반응 7 hr 후 시료의 TAG조성은 POP(PPO)가 33.4 area%로 감소한 반면, POS(PSO)는 23.31 area%로 증가하였다. 이 외에 PPS(15 area%), PPP(13.54 area%), PSS(2.69 area%), SOS(SSO)(2.1 area%) 그리고 SSS(0.1 area%) 등

Table 3. Triacylglycerol distribution in structured lipid product produced from lipase-catalyzed acidolysis of palm mid fraction (PMF) with stearic acid (SA) (Unit: wt%)

Peak number <sup>1)</sup>	PN <sup>2)</sup>	Compounds <sup>3)</sup>	PMF	PMF : SA = 1:2	
				Lipozyme TLIM 7 hr	20 wt% <sup>4)</sup> 36 hr
1	46	LOO	—	0.21	0.40
2	46	PLO	—	0.49	0.24
3	46	PLP	1.42	0.44	—
4	48	OOO	—	1.03	3.76
5	48	POO	—	6.42	3.12
6	48	POP/PPO	93.27	33.40	6.21
7	48	PPP	—	13.54	7.27
8	50	SOO	—	1.03	1.24
9	50	POS/PSO	5.30	23.31	20.70
10	50	PPS	—	15.00	28.19
11	52	SOS/SSO	—	2.10	8.28
12	52	PSS	—	2.69	18.13
13	54	SSS	—	0.10	2.46

<sup>1)</sup>Peak numbers and elution order from the RP HPLC chromatogram in Fig. 1.  
<sup>2)</sup>PN=total carbon numberm (CN)-2×total number of double bonds (ND).  
<sup>3)</sup>Proposed triacylglycerol structure: L=linoleoyl; O=oleoyl; P=palmitoyl; S=stearoyl.  
<sup>4)</sup>Lipozyme TLIM wt% based on the substrates amounts.

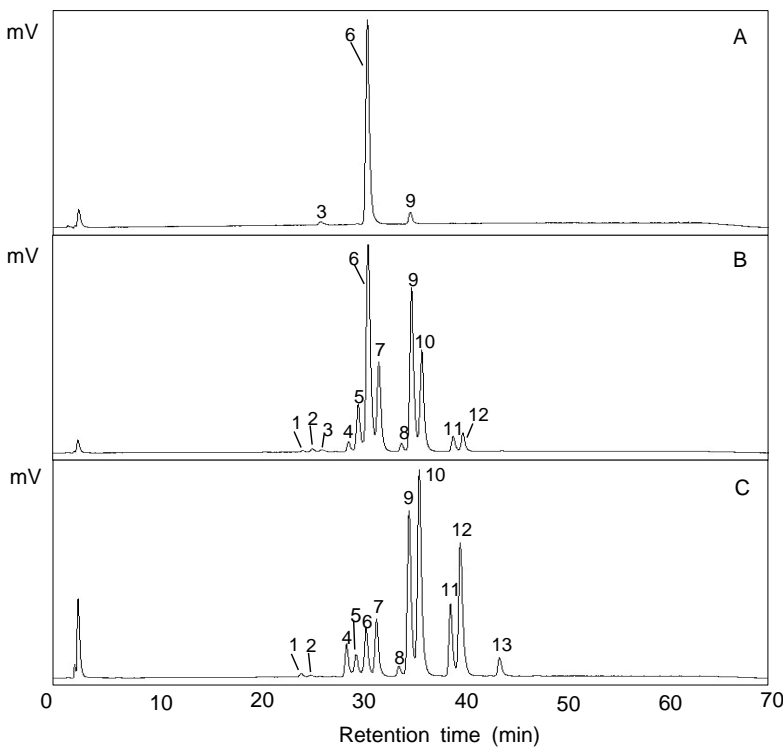


Fig. 2. Chromatogram from the reversed-phase high performance liquid chromatography separation of A: palm mid fraction B: structured lipids (PMF : stearic acid=1:2, lipozyme TLIM 20 wt%, 7 hr) C: structured lipids (PMF : stearic acid=1:2, lipozyme TLIM 20 wt%, 36 hr). 1: LOO, 2: PLO, 3: PLP, 4: OOO, 5: POO, 6: POP, 7: PPP, 8: SOO, 9: POS, 10: PPS, 11: SOS, 12: PSS, 13: SSS.

의 새로운 peak가 나타났다. 이는 sn-1,3 position에 특이적으로 작용하는 효소의 반응에 의해 stearic acid가 POP에 결합됨에 따라 POS(PSO), SOS(SSO)가 생겨났고, 이후 acyl migration에 의해 PPS, PSS, SSS 등으로 변화되었을 것으로 예측된다. 반응 36 hr 후 시료의 TAG 조성은 7 hr 반응했을 때에 비하여 POP가 크게 감소(7 hr: 33.4 area%, 36 hr: 6.21 area%)하였다. 하지만 반응이 진행됨에 따라 크게 증가할 것으로 예측했던 POS(PSO)의 경우 7 hr 반응했을 때보다 2.61% 감소하였다. 반면 7 hr 반응했을 때보다 PPS는 약 1.9배, PSS는 약 6.7배 증가하는 경향을 보였다. 이로써 lipozyme TLIM으로 반응할 경우 반응시간이 증가될수록 acyl migration 현상이 증가하여 PPS, PSS 등의 함량이 증가하였으며, POP와 SOS 형태보다는 PPO나 SSO 형태의 TAG가 생성되었을 것으로 예측된다.

이러한 acyl migration 현상을 확인하기 위하여 pancreatic lipase 분석을 통해 TAG의 sn-2 position 조성을 Table 2에 나타내었다. PMF와 stearic acid의 몰 비율 1:2로 7 hr 반응 후 시료의 TAG 중 sn-2 position에는 oleic acid 함량이 8.7%로 낮았고 palmitic acid와 stearic acid의 함량은 각각 66.6%, 24%로 나타났다. 이러한 결과로 sn-2 position에 oleic acid가 있는 POP, POS, SOS 형태보다는 PPO, PSO, SSO 등의 TAG가 더 많이 존재할 것으로 예측된다. 반응 36 hr 후 sn-2 position의 oleic acid와 palmitic acid의 함량은 각각 5.4%, 50.1%로 감소함을 나타내었고, stearic acid는 43.7%로 증가함을 나타내었다. 이는 반응시간이 증가할수록 acyl migration 현상의 증가로 인하여 개질된 PMF의 sn-2 position에 stearic acid 함량이 증가된 것이다. 또한 본 실험에서 용점이 70°C인 stearic acid를 기질로 사용하였기 때문에 반응온도를 70°C로 유지하였고 이 때문에 본래 1,3-position에 특이성을 가지고 있었던 lipozyme TLIM의 특성은 낮아지고 반면 acyl migration 현상이 증가하여 개질된 PMF에서 1,3-position 특이성이 나타나지 않은 것으로 사료된다.

## 요 약

PMF와 stearic acid를 기질로 하고, TAG의 sn-1,3 위치에 특이적으로 작용하는 lipozyme TLIM을 이용해 항온교반수조(70°C, 180rpm)에서 개질된 PMF(팜중부유)를 얻었다. 효소량을 20 wt%를 사용하였을 경우, 가장 높은 stearic acid 결합율을 보인 PMF와 stearic acid의 몰 비율은 1:2였고, 1:1.5와 비교적 비슷한 함량을 나타내었다. 이에 반해 1:0.5는 가장 낮은 결합율을 보였다. PMF와 stearic acid의 몰 비율 1:2일 때, 효소량을 20 wt% 사용하여 반응한 경우 stearic acid의 함량은 31.6%까지 증가한 반면, 효소량을 10 wt% 사용하였을 때는 13.4%까지 증가하여 효소량을 20 wt% 사용했을 때보다 2.4배 낮은 함량을 보였다. RP-HPLC

분석결과 반응 기질로 사용된 PMF는 대부분이 POP로 93.27 area%를 차지하였고, 효소 첨가량 20 wt%, PMF와 stearic acid의 몰 비율 1:2로 36 hr 반응한 시료의 TAG 조성은 7 hr 반응했을 때에 비하여 POP가 크게 감소(7 hr: 33.4 area%, 36 hr: 6.21 area%)하였다. 하지만 반응이 진행됨에 따라 크게 증가할 것으로 예측했던 POS(PSO)의 경우 7 hr 반응했을 때보다 2.61% 감소하였다. 반면 7 hr 반응했을 때보다 PPS는 약 1.9배, PSS는 약 6.7배 증가하는 경향을 보였다. 이로써 lipozyme TLIM으로 반응할 경우 반응시간이 지날수록 acyl migration 현상이 증가하는 것으로 예측되었다. 효소 첨가량 20 wt%, PMF와 stearic acid의 몰 비율 1:2로 36 hr 반응 후 시료의 TAG 중 sn-2 position에는 oleic acid 함량이 5.4%로 낮았고 palmitic acid와 stearic acid의 함량은 각각 50.1%, 43.7%로 나타났다. 이로써 개질된 PMF에서 효소의 sn-1,3 위치 특이성이 나타나지 않은 것으로 예측되었다.

## 감사의 글

본 연구는 2008년도 식품의약품안전청 용역연구개발사업의 연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## 문 헌

1. Gunstone FD. 2001. Structured triacylglycerols. In *Structured and modified lipids*. Marcel Dekker Inc., New York, USA. p 209-239.
2. Soumanou MM, Bornscheuer UT, Schmid RD. 1998. Two-step enzymatic reaction for the synthesis of pure structured triacylglycerides. *JAOCS* 75: 703-710.
3. Soumanou MM, Bornscheuer UT, Schmid RD. 1998. Synthesis of structured triglycerides by lipase catalysis. *Fett-Lipid* 100: 156-160.
4. Wang HX, Wu H, Ho CT, Weng XC. 2006. Cocoa butter equivalent from enzymatic interesterification of tea seed oil and fatty acid methyl esters. *Food Chem* 97: 661-665.
5. Park RK, Lee KT. 2003. Synthesis of structured lipids from corn oil and conjugated linoleic acid in the continuous type reactor. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 1200-1205.
6. Shin JA, Lee KT. 2004. Lipase-catalyzed synthesis of structured lipids with capric and conjugated linoleic acid in a stirred-batch type reactor. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 1175-1179.
7. Kristensen JB, Xu X, Mu H. 2005. Diacylglycerol synthesis by enzymatic glycerolysis screening of commercially available lipases. *JAOCS* 82: 329-334.
8. 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. *JAOCS* 75: 1179-1198.
9. Xu X. 2000. Enzymatic production of structured lipids: Process reactions and acyl migration. *INFORM* 11: 1121-1131.
10. Iwasaki Y, Yamane T. 2000. Enzymatic synthesis of structured lipids. *J Molecul Catal B: Enzymatic* 10: 129-140.
11. Schmid U, Bornscheuer UT, Soumanou MM, McNeill GP, Schmid RD. 1998. Optimization of the reaction conditions

- in the lipase-catalyzed synthesis of structured triglycerides. *JAOCS* 75: 1527-1531.
12. Schmid U, Bornscheuer UT, Soumanou MM, McNeill GP, Schmid RD. 1999. Highly selective synthesis of 1,3-oleoyl-2-palmitoylglycerol by lipase catalysis. *Biotechnol Bioeng* 64: 678-684.
  13. Gunstone FD. 2001. Cocoa butter and cocoa butter equivalents. In *Structured and modified lipids*. Marcel Dekker Inc., New York, USA. p 401-422.
  14. Bloober S, Adlercreutz P, Mattiasson B. 1990. Triglyceride interesterification by lipases. 1. Cocoa butter equivalents from a fraction of palm oil. *JAOCS* 67: 519-524.
  15. 식품의약품안전청. 2007. 식품등 중 기준규격미설정 물질의 시험방법. 식품의약품안전청고시. 제2007-10호.

(2009년 1월 13일 접수; 2009년 4월 6일 채택)