

효소적으로 합성된 대칭형과 비대칭형 Triacylglycerol 혼합물의 *In Vitro* Digestion에서의 소화율 비교

우정민 · 이기택*

충남대학교 식품공학과

Comparison of Hydrolysis from *In Vitro* Digestion Using Symmetric and Asymmetric Triacylglycerol Compounds by Enzymatic Interesterification

Jeong Min Woo and Ki Teak Lee[†]

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

ABSTRACT For developing indigestible lipids, symmetric triacylglycerol (ST) and asymmetric triacylglycerol (AT) were produced by enzymatic interesterification using high oleic sunflower oil, palmitic ethyl ester, and stearic ethyl ester in a shaking water bath. Used enzymes were Lipozyme RMIM for ST and Lipozyme TLIM for AT. To remove ethyl ester from reactants, methanol fractionation (reactant : methanol=1:5, w/v, 25°C) and florisil separation (reactant : florisil=1:8, w/w) were applied. Acetone fractionation (reactant : acetone=1:9, w/v) was implemented to separate triacylglycerol (TAG) species into ST and AT. Fractions I (before fractionation), II (after fractionation, liquid phase) and III (after fractionation, solid phase) were separated from ST, whereas fractions IV (after 1st fractionation, liquid phase) and V (after 2nd fractionation, solid phase) were from AT. From *sn*-2 fatty acid composition analysis, the sum of palmitic acid (C16:0) and stearic acid (C18:0) was 4.9~6.5 area% in ST (I, II, III), and 41.9~43.9 area% in AT (IV, V). *In vitro* digestion was performed for 0, 15, 30, 60, and 120 minutes at 37°C in a shaking water bath. For the digestion results, hydrolysis of V was only 40% compared to others (I, II, III, IV) at 120 minutes due to its melting point (49°C). However, initially (15 minutes), hydrolysis (%) was as follows: V < III < IV < I, II. This order was similar with that of melting point, and a higher TAG content (two saturated fatty acids) was associated with a higher melting point. On the other hand, fractions III and IV showed similar complete melting points (32.5°C, 31.8°C) and different slip melting points (31.3°C, 19.5°C). Even though IV has a lower TAG content composed of two saturated fatty acids than III, it had a similar melting point.

Key words: symmetric triacylglycerol, asymmetric triacylglycerol, melting point, *in vitro* digestion, hydrolysis

서 론

현대사회의 산업화에 따른 사회·경제 변화로 인해 식생활의 형태 또한 전통적인 식생활 방식에서 시간과 장소에 구애 받지 않고 필요할 때 식사를 하는 방식으로 변화하였다(1, 2). 또한 식생활이 서구화되면서 고지방식이 증가하게 되었으며, 이에 중장년층뿐만 아니라 식습관이 형성되는 시기인 청소년과 어린이도 서구 음식을 선호하게 되었다(3). 지방은 탄수화물과 단백질에 비해 5 kcal/g의 열량이 높아 같은 양을 섭취하여도 더 많은 에너지를 저장하는 것이 특징으로(4) 고지방식으로 인한 영양불균형, 비만, 체중과다와 같은 문제가 발생되었으며(5), 이는 고지혈증, 고혈압, 동맥경화와 같은 퇴행성 질환의 주 발병 요인으로 주목되어 왔다(6).

지방대체제는 fat mimics와 fat substitute로 나누어진다. Fat mimics는 9 kcal/g인 지방에 비해 4~4.5 kcal/g으로 열량을 낮출 수 있지만 주로 단백질과 탄수화물을 기반으로 하는 물질이기 때문에 높은 온도에서 사용이 불가능하다. 반면 fat substitute는 지방을 기반으로 하는 물질이기 때문에 인간의 소장에서 지방분해효소에 의해 소화되지 못하여 열량을 가질 수 없거나 낮은 열량을 내며, 기름과 1:1로 대체 가능하다는 장점이 있다. 또한 fat mimics와 달리 높은 온도에서 사용이 가능하고 지용성물질을 운반할 수 있으나 안전성이 확인되지 않은 물질들이 많아 사용량에 제한이 있는 실정이다(4). 이를 해결하기 위해 지방산과 글리세롤로 구성되어 있는 triacylglycerol(TAG)의 위치별 지방산 조성을 바꿔 난소화성 유지를 개발하려는 연구가 보고되고 있다(7).

재구성지질(structured lipid)은 TAG 내에서 화학적 또는 효소적 방법으로 지방산의 위치나 조성을 변화시킴으로써 합성된다(8). 화학적 방법은 무작위로 발생되고 부산물이 많이 생성되는데 반해, 효소적 방법은 위치 특이성을 가지고

Received 7 February 2014; Accepted 11 April 2014

*Corresponding author.

E-mail: kilee@cnu.ac.kr, Phone: +82-42-821-6729

있는 효소를 사용하기 때문에 특정 위치에 특정 지방산을 낮은 에너지로 합성할 수 있는 장점이 있다(9). 따라서 이를 이용하여 코코아 버터 대체지(10), trans free 마가린 stock (11), 모유 대체지(12) 등을 합성하고 있다.

Acylmigration은 acyl기가 sn-2 위치에서 sn-1(3) 위치로 이동하거나 sn-1(3) 위치에서 sn-2 위치로 이동하는 현상으로, monoacylglycerol(MAG) 또는 diacylglycerol(DAG)과 같은 부분적인 acylglycerol이 존재하기 때문에 발생한다. 그 결과 처음 위치하였던 것과 다른 위치의 지방산 조성을 가진 TAG 분자들이 생성되며, 생성물들의 평형이 이루어질 때까지 계속 진행된다. 이 현상은 반응온도가 높을수록, 사용 효소량이 많을수록, 반응시간이 길수록, 사용하는 효소의 수분 함량이 높을수록 발생할 가능성이 높으며 반응온도, 사용 효소량, 반응시간, 수분 함량 순으로 acylmigration에 영향을 많이 끼친다고 알려져 있다(13).

TAG의 소화는 위와 소장에서 일어나는 것으로 알려져 있다. 위에서는 섭취한 지방의 10~30% 정도가 소화되며, 주로 sn-3 위치의 지방산을 가수분해 시켜 1,2-DAG를 형성한다. 한편 소화되지 못한 TAG와 1,2-DAG는 소장으로 전달되어 담즙에서 분비된 담즙산에 의해 에멀전을 형성하여 pancreatic lipase와 작용할 수 있는 표면적을 넓히게 된다. 이 효소는 sn-1,3 특이성을 가져 TAG와 1,2-DAG를 2-MAG와 지방산으로 분해시키는 특성을 가지고 있다(14,15).

In vitro digestion은 인간의 소화반응을 모방한 것으로, 소화가 일어나는 부분인 입, 위, 소장의 소화액의 조성, pH, 섭취한 음식의 머무는 시간 등을 고려하여 반응을 진행하며 주로 물을 흡수하는 기능을 하는 대장은 생략하는 경우가 많다(16). 이를 통해 키토산의 lipid 소화 저해 가능성(17), 발효 귀리 추출물의 pancreatic lipase 활성 저해 효과(18), 위에서의 TAG 소화 저해 메커니즘(19), 토양 오염물질의 bioaccessibility 평가(20) 등을 연구하고 있으며, 주로 소장의 pancreatic lipase의 활성을 저해하는 물질을 찾거나 난소화성 유지를 개발하려고 하고 있다(7,21).

본 실험은 고올레산 해바라기유(high oleic sunflower oil, HOSO), stearic ethyl ester(StEE) 및 palmitic ethyl ester(PEE)를 기질로 사용하여 대칭형 유지와 비대칭형 유지를 합성하고 *in vitro* digestion system에서의 소화율 차이를 비교하고자 하였다. Lipozyme RMIM과 Lipozyme TLIM은 고정화 효소로 널리 이용되고 있으며, 특히 Lipozyme RMIM은 Lipozyme TLIM에 비해 TAG의 sn-1,3 위치에 반응하는 위치특이성이 강하다고 보고되어 있어(22) 대칭형 유지는 *Rhizomucor miehei*로부터 유래한 고정화 효소인 Lipozyme RMIM을 사용하고 비대칭형 유지는 *Thermomyces lanuginosus*로부터 유래한 고정화 효소인 Lipozyme TLIM을 사용하여 효소적 interesterification 반응을 실시하였으며, 대칭형/비대칭형 TAG가 높게 구성되어 있다고 예측되는 조건으로 대량 합성을 진행하였다. 그

후 methanol fractionation 및 florisil을 이용한 분별을 실행하여 ethyl ester를 제거하였고 acetone fractionation을 통해 TAG 조성을 달리하였으며, 이를 RP-HPLC를 통해 확인하였다. 한편 TAG의 총 지방산 및 sn-2 위치의 지방산 조성 분석, 황산동액을 이용한 melting point 분석과 differential scanning calorimetry(DSC)를 이용한 solid fat index(SFI) 측정을 통해 각 분별물들의 이화학적 특성을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

실험 재료

본 연구에서 기질로 HOSO는 CJ(Seoul, Korea)로부터, PEE와 StEE는 (주)네오메가(Daejeon, Korea)로부터 제공받아 사용하였다. 대칭형 유지 합성에 사용된 lipase는 RMIM으로 Novodisk Biochem. North American Inc.(Franklinton, NC, USA)로부터 구입하였으며, 비대칭형 유지 합성에 사용된 lipase는 TLIM으로 Novozymes사(Bagsvaerd, Denmark)로부터 구입한 것을 사용하였다. 합성물의 sn-2 위치의 지방산과 가수분해율(%)을 분석하기 위해 사용된 pancreatic lipase(Type II, crude) 및 *in vitro* digestion에서 internal standard로 사용된 tristearin(SSS, 순도: $\geq 99.0\%$)은 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. 한편 반응물의 ethyl ester 제거와 TAG의 조성을 달리하기 위해 사용된 diethyl ether, methanol, acetone, hexane은 normal-grade이었으며, 모든 기기 분석에 사용된 용매는 HPLC grade를 이용하였다.

기질의 시간에 따른 반응과 반응 조건 설정

전반적인 실험과정은 Fig. 1에 나타내었으며, 먼저 Lipozyme RMIM과 Lipozyme TLIM을 이용하여 대칭형과 비대칭형 정도가 다른 유지를 합성하고자 하였다. 1,3-dipalmitoyl-2-oleoylglycerol(POP), 1(3)-palmitoyl-2-oleoyl-3(1)-stearoyl(POS), 1,3-distearoyl-2-oleoylglycerol

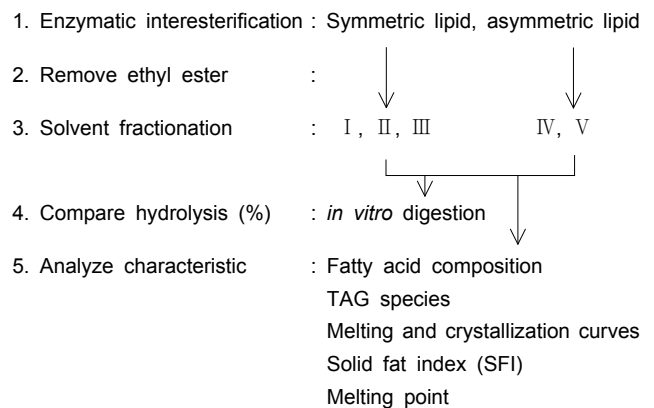


Fig. 1. Scheme of overall process.

(SOS)과 같은 대칭형 TAG의 조성이 높게 예상되는 합성 조건을 선정하기 위하여 다음과 같은 조건에서 실험을 진행하였다. 50 mL vial에 HOSO, PEE 및 StEE를 1:1:1의 몰비율(w/w)로 총 2 g을 취한 후, 기질 무게의 10%인 Lipozyme RMIM과 hexane 3 mL를 첨가하였다. 반응은 shaking water bath(LSB-0455, Daihan labtech Co., Ltd., Namyangju, Korea)에서 46°C, 185 rpm의 조건으로 진행하였으며 1, 2, 3, 4, 5, 6시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 반응물을 0.5 µm PTFE syringe filter(13JP050AN, ADVANTEC, Tokyo, Japan)에 통과시켜 lipase 및 불순물을 제거하였으며, 남아있는 용매는 질소를 이용하여 제거하였다. 한편 1,2-dipalmitoyl-3-oleoyl-glycerol(PO), 1-palmitoyl-2-stearoyl-3-oleoyl-glycerol(PSO), 1,2-distearoyl-3-oleoylglycerol(SSO)과 같은 비대칭형 TAG의 조성이 높게 예상되는 합성 조건을 선정하기 위한 반응은 위와 같은 방법에서 다음 조건만 달리하여 실험을 진행하였다. Xu 등(13)에 의해 반응온도, 효소량, 반응시간에 따라 acylmygration 현상 유도가 쉽다고 보고되어 있어, 기질을 70°C의 온도에서 1, 3, 6, 9, 12시간 동안 반응하였고, 효소는 기질 무게 20%의 Lipozyme TLIM을 사용하였다.

반응물의 위치별 지방산 조성 분석 결과, Lipozyme RMIM 반응물은 반응시간이 3시간일 때 비교적 높은 대칭형 유지를 얻을 수 있었고, Lipozyme TLIM 반응물은 반응시간이 6시간일 때 비교적 높은 비대칭형 유지를 얻을 수 있어, 이를 반응 조건으로 설정하였다. 선정된 조건으로 총 40 g의 기질과 각각의 효소를 250 mL screw cap이 있는 삼각플라스크에 첨가한 후 hexane 60 mL를 가하여 대량 합성을 진행하였다.

효소적 interesterification 반응물의 ethyl ester 제거

효소적 interesterification 반응 후 ethyl ester를 제거하기 위해 용매 분별(solvent fractionation)과 florisil을 이용한 separation을 진행하였다(23,24). 용매 분별은 TAG에 비해 ethyl ester가 methanol에 잘 용해되는 성질을 이용하였다. 완전히 녹인 시료와 methanol의 비율이 1:5(w/v)가 되게 50 mL vial에 취한 뒤 균질화 하여 25°C incubator에서 3시간 방치하였다. Lipozyme RMIM 반응물은 두 액체층으로 분리가 되어 하층액만을 취하였으며, Lipozyme TLIM 반응물은 고체층과 액체층으로 분리가 되어 filter paper를 통과시켜 고체층만을 취하여 ethyl ester를 일부 제거하였다. 제거되지 않은 ethyl ester는 florisil을 이용하여 완전히 제거하였다. 이는 극성 차이를 이용하여 ethyl ester와 TAG를 분리하는 것으로 길이 42.5 cm, 폭 4 cm의 column에 시료 1 g당 8 g의 florisil을 이용하였다. 500 mL의 hexane : diethyl ether=99.7:0.3(v/v) 용매에 시료를 녹여 column을 통과시킨 후 ethyl ester를 획득하였으며, 그 다음 500 mL의 diethyl ether를 column에 흘려 준 후 감압농축기를 이용하여 ethyl ester를 제외한 반응물을 얻었다.

용매 분별을 이용한 효소적 반응물의 TAG 조성 변화

Ethyl ester를 제거한 반응물의 TAG 조성을 달리하기 위해 Lee와 Foglia(23)의 방법을 일부 수정하여 사용하였다. Lipozyme RMIM 반응물(I)은 완전히 녹인 시료와 acetone의 비율을 1:9(w/v)로 하여 교반한 후 6°C의 incubator에서 24시간 동안 정치시켰다. 그 후 filter paper를 통과시켜 POP/PPO, POS/PSO, SOS/SSO가 많이 함유된 고체층(III)과 적게 함유된 액체층(II)을 얻었다. Lipozyme TLIM 반응물은 PPP, PPS/PSP와 같은 포화-포화-포화지방산으로 이루어진 고흡점의 TAG를 함유하여 이를 먼저 제거하였다. 완전히 녹인 시료와 acetone의 비율을 1:9(w/v)로 하여 교반한 다음, 18°C incubator에서 15시간 동안 정치하였다. 분리된 고체층과 액체층 중 filter paper를 이용하여 액체층만을 취하였고 질소를 이용하여 용매를 제거하였다. 그 후 액체층으로부터 얻은 분획물(IV)을 완전히 녹인 다음, 분획물 무게의 9배인 acetone을 첨가하였다. 충분히 용해되도록 교반한 다음 6°C의 incubator에서 24시간 정치시켜 PPO/POP, PSO/POS, SSO/SOS가 많이 함유된 고체층(V)을 얻었다.

RP-HPLC 분석

분별물들의 TAG 조성을 알아보기 위하여 reversed-phase high pressure liquid chromatograph(RP-HPLC, Younglin, Anyang, Korea)를 사용하였다(25). Column은 Nova-pak[®]C-18 60 Å 4 µm(3.9×150 mm I.d., Waters, Milford, Ireland)를 사용하였으며, 펌프는 Younglin SP 930D dual pump를 사용하였다. 이동상으로는 용매 A(acetonitrile)와 용매 B(iso-propanol : hexane=2:1, v/v)를 사용하였으며, 용매 A와 B를 80:20(v/v)에서 54:46(v/v)으로 45분까지 변화시킨 뒤 15분간 유지하였다. 그 후 80:20(v/v)으로 65분까지 변화시킨 뒤 70분까지 유지하였다. 유속은 1 mL/min이었으며, detector는 sedex 75 evaporative light scattering detector(ELSD, Seder, Alfortville, France)를 사용하였다. 시료는 4 mg/mL의 농도로 chloroform에 완전히 녹여 10 µL injection 하여 분석하였으며, TAG의 partition number(PN)의 계산식은 다음과 같다(26).

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

지방산 조성 분석

반응물의 TAG를 구성하는 지방산의 조성은 thin layer chromatography(TLC)와 gas chromatography(GC)를 이용하여 분석하였다(27). 기질 50 µL를 chloroform 200 µL에 희석한 후 petroleum ether, diethyl ether 및 acetic acid(90:10:1, v/v/v)를 전개용매로 하여 TLC(20×20 cm, Merck, Darmstadt, Germany)에 전개한 다음 TAG band만을 취하였다. 취한 TAG band는 methylation을 통해 GC

로 분석하였다. Methylation은 test tube에 TAG band와 0.5 N methanolic NaOH를 1.5 mL 첨가·진탕한 후 온도가 100°C인 water bath에서 5분 동안 중탕하였다. 이를 충분히 냉각한 후 BF₃-methanol 용액을 2 mL 첨가·진탕한 다음 100°C water bath에서 3분 동안 중탕하고 냉각하였다. 그 후 iso-octane을 2 mL, 포화 NaCl 용액을 1 mL 첨가한 후 충분히 교반하였다. 원심분리(2,500 rpm, 3 min)를 통해 분리된 상층액을 anhydrous sodium sulfate column에 통과시켜 불순물 및 수분을 제거하였으며, 이를 농축시켜 GC로 분석하였다. GC(YL6100GC, 6000 series, Younglin) 분석에 detector는 flame ionized detector(FID)를 사용하였으며, column은 SPTM-2560(100 m×0.25 mm I.D.×0.2 μm film thickness, Supelco, Bellefonte, PA, USA)을 사용하였다. Oven의 초기 온도는 150°C이며, 이를 5분간 유지시킨 후 4°C/min으로 승온시켜 220°C에서 30분간 유지하였다. 이때 injector와 detector의 온도는 250°C와 260°C였다. Carrier gas는 He를 사용하여 1 mL/min으로 흘려주었으며, 시료는 1 μL를 주입하여 지방산 조성을 분석하였다.

반응물의 지방산 조성 분석 결과, 전반적으로 palmitic acid(C16:0), stearic acid(C18:0), oleic acid(C18:1)가 주요 지방산으로 분석되었으며 반응시간에 따라 반응물을 구성하는 TAG의 총 지방산 조성과 sn-2 위치의 지방산 조성 변화를 간단하게 알아보기 위해 (P+S)/O%와 같은 비율을 이용하였다. 이는 palmitic acid(area%)와 stearic acid(area%)의 합을 oleic acid(area%)로 나눈 값에 100을 곱하여 구하였다.

Pancreatic lipase를 이용한 위치별 지방산 조성 분석

반응물의 위치별(sn-2, sn-1,3) 지방산 조성 분석을 위해 pancreatic lipase를 이용하여 가수분해를 진행하였다(27). 시험관에 7~10 mg의 시료를 취한 후 1 M Tris-HCl buffer(pH 7.6)를 7 mL, 0.05% 담즙산염을 1.75 mL, 2.2% CaCl₂ 용액을 0.7 mL 첨가하였다. 또한 시료의 양과 동일한 양의 pancreatic lipase를 첨가하여 1분 동안 충분히 교반하였다. 이를 37°C 항온수조에서 3분 동안 반응시킨 후 30초 동안 진탕하였고, 이 과정을 총 3회 반복하였다. Diethyl ether를 4 mL 첨가하여 1분 동안 교반한 후 상층액을 취하여 anhydrous sodium sulfate로 불순물 및 수분을 제거하였다. 질소를 이용하여 용매를 완전히 제거한 후 diethyl ether를 150 μL 첨가하여 교반하였고, 이를 TLC에 전개하여 2-MAG band만을 취하였다. 전개용매로는 hexane, diethyl ether 및 acetic acid(50:50:10, v/v/v)를 이용하였다. 이후 methylation을 진행하여 GC에 의한 지방산 분석을 실행하였다.

In vitro digestion

In vitro digestion 과정은 Versantvoort 등(16)의 di-

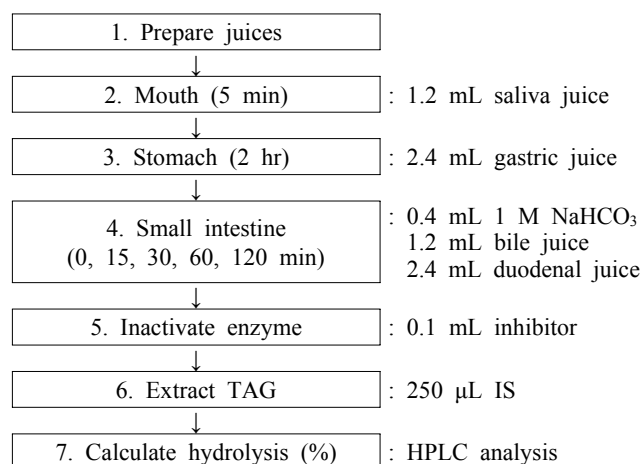


Fig. 2. Scheme of *in vitro* digestion process.

gestion model을 일부 수정하여 이용하였으며 전반적인 실험 과정은 Fig. 2에 나타내었다. 사용된 모든 소화 용액들(digestive juices)은 실험 당일 제조되었으며, 용액 제조 시 필요한 pH 조절은 37±2°C에서 이루어졌다. 반응은 37°C shaking water bath에서 80 rpm으로 진행되었으며, 먼저 100 mL 삼각 플라스크에 완전히 녹여 균질화한 시료(I, II, III, IV, V)를 100 mg 쟀 후 saliva juice를 1.2 mL 첨가하여 5분간 반응하였다. Gastric juice를 2.4 mL 첨가한 후 2시간 반응한 다음 1 M NaHCO₃를 0.4 mL, bile juice를 1.2 mL, duodenal juice를 2.4 mL 순으로 첨가하여 0, 15, 30, 60, 120분 동안 반응을 진행하였다. 0분의 경우 lipase와 pancreatin이 첨가되지 않은 duodenal juice를 이용하였다. 반응이 끝난 후 0.2 g의 4-bromophenylboronic acid에 대하여 1 mL의 methanol로 녹여 제조한 inhibitor를 0.1 mL 첨가·진탕시킴으로써 효소를 불활성화 시켰으며, internal standard(IS)로 tristearin(SSS)을 이용하여 추출 정도를 알아보려고 하였다. IS는 3 mg의 SSS에 대하여 250 μL의 chloroform으로 녹여 제조하였고, 이를 반응물이 담겨 있는 삼각플라스크에 250 μL 첨가한 후 균질화 하였다. 균질화된 반응물을 50 mL vial에 옮긴 후 chloroform 10 mL로 삼각플라스크를 세척하였으며, 세척한 chloroform을 50 mL vial에 옮긴 다음 3,000 rpm에서 10분 동안 원심분리를 진행하였다. TAG가 녹아있는 하층액을 sodium sulfate anhydrous column을 통과시켜 수분 및 불순물을 제거하였으며, 이를 3반복 진행한 후 질소를 이용하여 용매를 제거하였다. 한편 가수분해율(%)은 다음과 같은 방법으로 계산하였다. 먼저 반응한 시료의 무게가 동일하지 않기 때문에 이를 통일하기 위해 RP-HPLC를 이용하여 각 TAG의 area를 구한 뒤 시료무게를 100 mg으로 보정하였다. 그 후 추출률을 고려하기 위해 IS의 area를 보정하고 반응시간(15, 30, 60, 120분)에 따라 가수분해율(%)을 구하였다.

$$\text{Hydrolysis (\%)} = (A/B) \times 100$$

A: after digestion, TAG area in consider of sample

weight and extraction rate

B: before digestion, TAG area in consider of sample weight and extraction rate

Melting point 측정

Melting point는 저융점 TAG를 많이 함유하여 상온에서 oil 형태로 존재하는 I 과 II의 융점을 측정하기 위해 AOCS Official Method Cc 1-25(28)를 일부 변경하여 이용하였다. 시료(I, II, III, IV, V)를 capillary tube(75 mm×1.2 mm I.d., Chase Scientific Glass Inc., Rockwood, TN, USA)에 1 cm까지 취하여 -20°C에서 4시간 이상 균한 후 온도계에 모세관을 부착시켰다. 이를 열전도율이 높은 황산 동 용액에 담근 후 8~10°C의 온도에서부터 1분에 0.5°C씩 온도가 증가하도록 중탕하여 시료가 뜨는 순간의 온도인 slip melting point 및 시료가 완전히 녹는 온도인 complete melting point를 측정하였다.

DSC 분석

Differential scanning calorimetry(DSC)는 시료의 물리적인 상태를 변화시킴으로써 일어나는 열의 흡수나 방출 에너지를 측정하는 기기로, 다음과 같은 방법으로 분석을 진행하였다(11). 빈 cell을 이용하여 calibration을 함으로써 base line을 얻었으며, 시료(I, II, III, IV, V)는 5~10 mg을 취하여 분석하였다. 온도는 80°C까지 승온하여 10분 동안 유지한 후 10°C/min의 비율로 -60°C까지 냉각시켜 10분 동안 유지하였다. 그 후 80°C까지 5°C/min의 비율로 승온하여 melting 및 crystallization thermogram을 얻었다.

통계처리

실험 결과의 통계처리는 3개 이상의 집단을 비교할 경우

SAS(Statistical Analysis System) 9.2(SAS, Cary, NC, USA)를 이용하여 Duncan's multiple range test를 수행하였으며, 2개의 집단을 비교할 경우 Student t-test를 수행하여 $P < 0.05$ 수준에서 각 그룹 간의 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

대량 합성을 위한 합성 조건 screening 실험

대량 합성을 위한 합성 조건 screening 실험으로 합성 목적에 따라 반응시간, 반응온도, 사용효소, 효소 사용량을 달리하여 얻은 반응물과 HOSO의 위치별 지방산 조성 분석 결과는 Table 1과 같다. TAG의 총 지방산 조성에서는 비율 값((P+S)/O%)이 높을수록 효소적 interesterification 반응으로 인해 palmitic acid와 stearic acid의 함량이 높은 것을 나타내었고, *sn*-2 위치의 지방산 조성에서는 비율 값이 높을수록 acyl기가 이동하는 현상인 acylmigration이 많이 일어났음을 의미하였다. Lipozyme RMIM(0시간; HOSO)은 TAG의 총 지방산 조성에서 비율 값이 8.9%, palmitic acid와 stearic acid 함량의 합(P+S)이 7.3 area%로 나타났고, *sn*-2 위치의 지방산 조성에서는 0.3%와 0.2 area%로 나타나 주로 oleic acid로 이루어졌음을 알 수 있었다. 한편 반응 시간에 따른 Lipozyme RMIM 반응물의 총 지방산 조성을 분석한 결과, 반응시간(1, 2, 3, 4, 5, 6시간)이 증가함에 따라 비율 값이 41.3~64.4%로 증가하였으나 4시간 이후에서는(60.2~64.4%) 3시간(61.2%)과 유의적 차이가 없었다. 또한 *sn*-2 위치의 지방산 조성에서는 0.9~3.4%로 다소 증가하는 경향을 나타내었는데, 이는 반응시간이 증가하면서 acylmigration이 발생하였지만 사용된 효소가 강한 *sn*-1,3 위치 특이성을 가지고 있기 때문에 낮은 값을 나타낸 것으로 판단된다(22). 반면 Lipozyme TLIM 반응물의 총 지방산

Table 1. Fatty acid composition of reactants at different times and enzymes

Fatty acid (area%)	Time (hr)	<i>sn</i> -2			TAG		
		P+S	O	(P+S)/O% ²⁾	P+S	O	(P+S)/O%
Lipozyme RMIM 1:1:1 ¹⁾	0	0.2±0.1 ^c	87.9±0.1	0.3±0.1 ^c	7.3±0.1 ^f	81.4±0.3 ^a	8.9±0.2 ^f
	1	0.8±0.1 ^{bc}	88.1±0.2	0.9±0.1 ^{bc}	26.8±0.5 ^e	64.9±0.5 ^b	41.3±1.1 ^e
	2	0.9±0.1 ^{bc}	88.3±0.6	1.0±0.1 ^{bc}	32.7±0.1 ^d	59.4±0.1 ^c	55.1±0.1 ^d
	3	1.0±0.1 ^{bc}	88.1±1.1	1.1±0.1 ^{bc}	35.0±0.3 ^{bc}	57.3±0.3 ^d	61.2±0.8 ^{bc}
	4	2.4±1.4 ^a	86.3±0.8	2.8±1.7 ^a	34.5±0.1 ^c	57.3±0.1 ^d	60.2±0.1 ^c
	5	2.1±0.4 ^{ab}	87.2±0.6	2.4±0.5 ^{ab}	35.8±0.6 ^{ab}	56.8±0.7 ^d	63.0±1.8 ^{ab}
	6	2.9±0.0 ^a	86.1±0.7	3.4±0.0 ^a	36.3±0.2 ^a	56.4±0.2 ^d	64.4±0.7 ^a
Lipozyme TLIM 1:1:1	0	0.2±0.1 ^c	87.9±0.1 ^a	0.3±0.1 ^e	7.3±0.1 ^e	81.4±0.3 ^a	8.9±0.2 ^e
	1	12.7±1.1 ^d	77.7±0.2 ^b	16.3±1.4 ^d	33.9±0.1 ^d	57.8±0.1 ^b	58.7±0.4 ^d
	3	32.0±0.1 ^c	60.9±0.4 ^c	52.5±0.5 ^c	41.1±0.3 ^c	51.7±0.2 ^c	79.5±0.8 ^c
	6	39.9±2.4 ^b	54.0±1.6 ^d	74.0±6.7 ^b	43.2±0.5 ^b	49.9±0.5 ^d	86.6±1.8 ^b
	9	44.5±1.1 ^a	50.1±0.8 ^e	89.0±3.7 ^a	44.1±0.7 ^{ab}	49.5±0.2 ^d	89.1±1.8 ^{ab}
	12	46.2±0.1 ^a	49.3±0.5 ^e	93.8±0.7 ^a	44.7±0.7 ^a	49.0±0.7 ^d	91.1±2.6 ^a

¹⁾Molar ratio (high oleic sunflower oil : palmitic ethyl ester : stearic ethyl ester).

²⁾P: palmitic acid, S: stearic acid, O: oleic acid.

All values are shown as mean±SD (n=2).

^{a-f}Means with different superscripts in same column are significantly different at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

조성을 분석한 결과, 반응시간(1, 3, 6, 9, 12시간)이 증가할수록 비율 값이 58.7~91.1%로 증가하였으나 9시간에서부터는 유의적 차이가 없었다. 한편 *sn*-2 위치의 지방산 조성에서는 Lipozyme RMIM 반응물과 달리 16.3~93.8%로 급격하게 증가하는 것을 알 수 있었으며, 이는 Lipozyme TLIM이 Lipozyme RMIM에 비해 위치특이성이 적으며, 사용한 효소량, 반응온도, 반응시간이 acylmigration에 영향을 끼쳤기 때문인 것으로 판단된다(13,22). 분석 결과를 종합한 결과, Lipozyme RMIM 반응물은 반응시간이 3시간일 때 반응물의 총 지방산 조성에서는 비율 값이 61.2%, *sn*-2 위치의 지방산 조성에서는 1.1%로 나타나 대칭형의 TAG를 획득할 수 있을 것으로 예상되었다(29). 반면 Lipozyme TLIM 반응물은 반응시간이 6시간일 때 반응물의 총 지방산 조성에서는 비율 값이 86.6%, *sn*-2 위치의 지방산 조성에서는 74.0%로 나타나 비대칭형의 TAG를 얻을 수 있으며, 포화-포화-포화지방산으로 구성된 TAG의 생성 가능성이 낮을 것으로 예상되었다(30). 따라서 본 조건을 토대로 하여 대량 합성을 진행하였다.

분별한 반응물의 TAG 조성 변화

Acetone을 이용하여 분별한 반응물들의 TAG 조성 변화를 알아보기 위해 RP-HPLC를 통해 분석한 결과는 Table 2와 같다. TAG를 구성하는 각 지방산의 탄소 수와 이중결합수에 따라 PN(partition number)을 구하여 peak를 분리 및 분석하였으며, 주요 TAG 조성은 PN 46~52의 범위에서 나타났다. Lipozyme RMIM 반응물은 6°C에서 24시간 동안 분별을 진행하기 전(I)에는 POP/PPO, POS/PSO, SOS/SSO가 5.1, 16.2, 4.5 area%로 나타났으나, 분별 후 고체층(III)에서는 10.8, 44.3, 15.4 area%로 모두 증가하였다. 반

면 분별 후 액체층(II)에서는 상대적으로 낮은 2.8, 2.9, 0.4 area%를 함유함을 알 수 있었다. 그리고 저융점을 가지는 TAG(OOO, POO/OPO, SOO/OSO)는 I 과 II에서 15.1~28.8 area%와 18.9~38.7 area%로 높은 함량이 검출되었지만, III에서 5.2~12.2 area%의 낮은 함량이 검출되는 것으로 나타났다. 한편 Lipozyme TLIM 반응물은 분석 결과, 고융점의 TAG(PPP, PPS/PSP, SSS, PSS/SPS)를 함유하고 있어 1st fractionation을 통해 제거하였다(IV). 이 과정에서 PPO/POP, PSO/POS, SSO/SOS가 9.6, 22.1, 6.3 area%에서 8.1, 22.9, 5.7 area%로 다소 조성 변화가 있었다. 반면 6°C에서 24시간 동안 2nd fractionation을 진행한 결과(V), 9.2, 50.8, 21.9 area%로 모두 증가하였으며 PPP, PPS/PSP와 같은 높은 융점을 가진 TAG가 0.1, 0.1 area%로 미량 검출되었다. 이는 2nd fractionation을 진행하면서 상대적으로 높은 융점을 가진 TAG만을 분리하여 얻었기 때문에 IV에서 검출되지 않았던 고융점 TAG 비율이 증가하여 검출된 것으로 판단된다.

분별한 반응물들의 위치별 지방산 조성

효소적 interesterification에 의해 합성된 반응물들의 분별과정에 따른 위치별 지방산 조성 분석 결과는 Table 3과 같다. 전반적으로 합성 조건을 screening 하기 위해 50 mL vial에서 반응하던 것과는 달리 대량 합성에서는 screw cap이 있는 250 mL 삼각플라스크에서 반응하여 *sn*-2 위치의 비율 값((P+S)/O%)이 높게 나왔다. 이는 삼각플라스크 모양의 특성상 벽면이 비스듬하여 효소와 기질의 충돌이 잦아 반응성이 높아진 것으로 생각된다. 한편 분별물들의 위치별 지방산 조성 분석 결과, Lipozyme RMIM 반응물(대칭형 유지; I, II, III)은 *sn*-2 위치의 지방산 조성에서 비율 값이

Table 2. Triacylglycerol species of reactants removed ethyl ester and fractionated after different enzyme reactions (Unit: area%)

PN ¹⁾	Species ²⁾	Lipozyme RMIM			Lipozyme TLIM		
		Fractionation			Before	1st fractionation (IV)	2nd fractionation (V)
		Before (I)	After				
			Liquid phase (II)	Solid phase (III)			
<46	DAG ³⁾	4.8	4.6	1.3	4.5	6.0	1.3
46	LOO	0.8	1.7	0.4	1.9	0.7	0.1
	LLS/PLO/POL	0.9	2.2	0.6	2.5	0.9	0.2
48	OOO	15.1	18.9	5.2	7.9	9.6	1.8
	POO/OPO	28.8	38.7	12.2	23.3	25.3	6.5
	POP/PPO	5.1	2.8	10.8	9.6	8.1	9.2
	PPP	ND ⁴⁾	ND	ND	0.4	ND	0.1
50	SOO/OSO	23.8	27.8	9.6	15.8	20.7	7.9
	POS/PSO	16.2	2.9	44.3	22.1	22.9	50.8
	PPS/PSP	ND	ND	ND	2.4	ND	0.1
52	SOS/SSO	4.5	0.4	15.4	6.3	5.7	21.9
	PSS/SPS	ND	ND	ND	2.2	ND	ND
54	SSS	ND	ND	ND	0.9	ND	ND
54<		ND	ND	0.2	0.2	0.1	0.1

¹⁾PN: partition number=total carbon number (CN)-2[total number of double bonds (ND)].

²⁾Species: L=linoleic acid, O=oleic acid, P=palmitic acid, S=stearic acid.

³⁾DAG: diacylglycerol. ⁴⁾ND: not detected.

Table 3. Fatty acid composition of reactants removed ethyl ester and fractionated after different enzyme reactions

Fatty acid (area%)	Lipozyme RMIM			Lipozyme TLIM			
	Before (I)	After		Before	1st fractionation (IV)	2nd fractionation (V)	
		Liquid phase (II)	Solid phase (III)				
<i>sn</i> -2	P+S	5.2±1.5	6.5±0.4	4.9±0.0	48.1±0.1	43.9±0.1	41.9±0.5
	O	82.3±2.5	81.5±0.7	85.8±0.9	46.4±0.6	52.5±0.4	53.3±0.4
	(P+S)/O% ¹⁾	6.3±2.0	8.0±0.6	5.8±0.1	103.7±1.1	83.6±0.8	78.5±1.6
TAG	P+S	38.0±0.0	32.4±0.0	48.5±0.2	51.2±0.3	43.3±0.2	54.1±0.4
	O	52.7±0.1	57.4±0.0	45.6±0.1	42.5±0.1	50.8±0.2	41.6±0.2
	(P+S)/O%	72.1±0.2	56.5±0.0	106.4±0.7	120.4±0.8	85.3±0.7	130.2±1.6

¹⁾P: palmitic acid, S: stearic acid, O: oleic acid.

All values were shown as mean±SD (n=2).

5.8~8.0%, palmitic acid와 stearic acid의 합(P+S)은 4.9~6.5 area%로 낮아 주로 대칭형으로 이루어짐을 확인하였다. TAG의 총 지방산 조성에서는 P+S가 32.4~48.5 area% 범위로 나타났으며, 그중 I(38.0 area%)과 II(32.4 area%)는 P+S가 서로 유사한 것으로 나타났다. 이는 I이 II에 비해 POO/OPO와 SOO/OSO의 함량이 약 14 area% 적은 반면 POS/PSO가 약 13 area% 많기 때문에 나타난 결과인 것으로 판단된다. 한편 Lipozyme TLIM 반응물(비대칭형 유지; 분별 전 반응물, IV, V)은 *sn*-2 위치의 지방산 조성에서 비율 값과 P+S가 78.5~103.7%와 41.9~48.1 area%로 높아 Lipozyme RMIM 반응물에 비해 비대칭형으로 이루어져 있는 것을 확인하였다. 그리고 총지방산 조성에서는 1st fractionation을 진행하여 액체층(IV)을 취하면서 SSS와 같은 고흡점의 TAG가 제거되어 P+S가 51.2 area%에서 43.3 area%로 감소하는 것으로 나타났다. 또한 2nd fractionation을 통해 고체층(V)을 취한 후에는 POS/PSO와 SOS/SSO의 함량이 약 44 area% 가량 높아졌기 때문에 P+S가 54.1 area%로 증가함을 알 수 있었다. 한편 모든 분별물들의 총 지방산 조성에서의 P+S 함량을 비교하였을 때, 포화지방산 함량이 높아질수록(II < I < IV < III < V) 두 개의 포화지방산으로 구성된 TAG(ex. POP/PPO)의 함량이 높아지는 것으로 확인되었다(10,29).

각 분별물간의 소화율 비교

분별한 반응물들을 이용하여 *in vitro* digestion을 진행한 결과는 Fig. 3에 나타내었으며, 전반적으로 반응시간(0, 15, 30, 60, 120분)이 증가함에 따라 지방산은 증가하고 TAG는 감소하는 경향을 보였다(Fig. 4). 또한 RP-HPLC 분석 결과를 이용하여 반응시간에 따른 분별물들의 가수분해율(%)과 농도변화량(mg/mL/min)을 구한 결과, 두 결과가 서로 유사함을 알 수 있었다. 이는 가수분해율 계산 결과를 이용하여 농도변화량을 구하였기 때문이며, 따라서 가수분해율(%)만 본 논문에서 표시하였다. 0분에서부터 120분까지 소화를 진행한 결과, 초기(15, 30, 60분)에는 분별물들 간에 가수분해율 차이가 있었지만 120분 후에는 V만 다른 분별물(I, II, III, IV)에 비해 약 40% 정도 소화가 되지 않았다. 이는

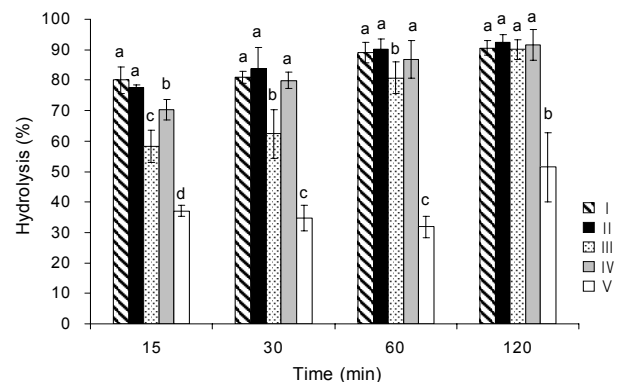


Fig. 3. Comparison of hydrolysis (%) from *in vitro* digestion at different time (15, 30, 60, and 120 minutes) among I, Lipozyme RMIM reactant before fractionation; II, Lipozyme RMIM reactant after fractionation (liquid phase); III, Lipozyme RMIM reactant after fractionation (solid phase); IV, Lipozyme TLIM reactant after 1st fractionation (liquid phase); V, Lipozyme TLIM reactant after 2nd fractionation (solid phase). ^{a-d)}Means with different letters in same time are significantly different at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

총 지방산 조성에서 P+S의 함량(54.1 area%)이 가장 높아 두 개의 포화지방산으로 구성된 TAG(ex. POP/PPO, 81.9 area%)가 다른 분별물들에 비해 많이 함유되어 있기 때문인 것으로 판단된다. 한편 초기(15, 30분) 가수분해율을 보았을 때 III, IV, V의 가수분해율이 IV 70.3~79.9%, III 58.3~62.4%, V 37.0~34.8% 순으로 낮게 나타났으며, 농도변화량에서도 IV 0.62~0.35 mg/mL/min, III 0.51~0.27 mg/mL/min, V 0.32~0.15 mg/mL/min 순으로 낮게 나타났다. 이는 총지방산 조성에서의 P+S의 함량이 IV(43.3 area%), III(48.5 area%), V(54.1 area%) 순으로 높아지면서 두 개의 포화지방산으로 구성된 TAG 함량도 IV(36.7 area%), III(70.5 area%), V(81.9 area%) 순으로 증가하였기 때문인 것으로 생각된다. 분석 결과를 종합한 결과, 총지방산 조성에서의 포화지방산 함량이 높을수록 두 개의 포화지방산으로 구성된 TAG의 함량이 높아져 유지의 가수분해율(%)이 낮아지는 것을 알 수 있었으며, 두 개의 포화지방산으로 구성된 TAG는 한 개의 포화지방산으로 구성된 TAG보다 상대적으로 높은 융점을 가지기 때문에(7) 가수분해율은 유

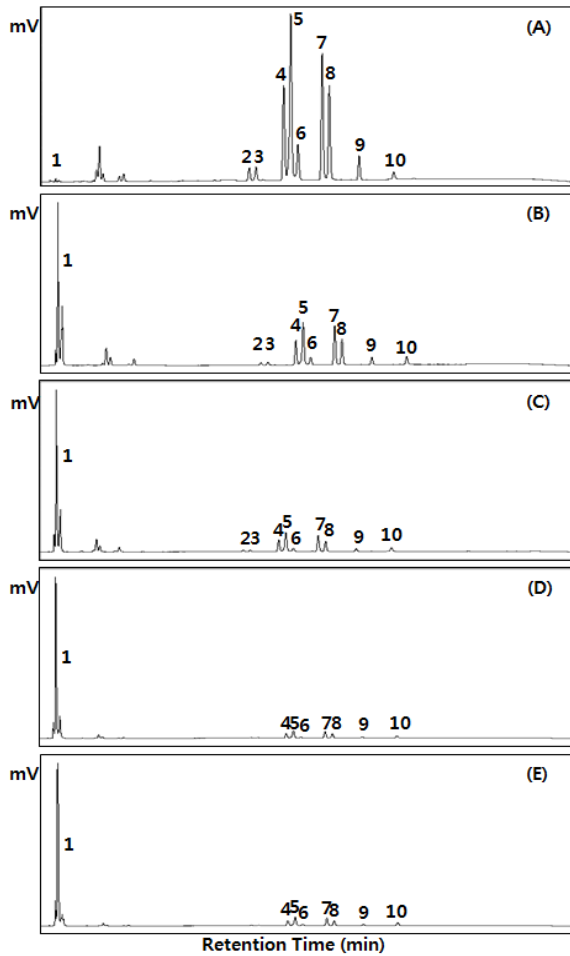


Fig. 4. RP-HPLC chromatogram from *in vitro* digestion of Lipzyme RMIM reactant before fractionation; I (molar ratio=high oleic sunflower oil : palmitic ethyl ester : stearic ethyl ester=1:1:1, enzyme=Lipzyme RMIM, temperature=46°C, reaction time=3 hr, shaking water bath reactor). (A) digestion time=0 min, (B) 15 min, (C) 30 min, (D) 60 min, (E) 120 min. 1, fatty acids; 2, LOO; 3, LLS/PLO/POL; 4, OOO; 5, POO/OPO; 6, POP/PPO; 7, SOO/OSO; 8, POS/PSO; 9, SOS/SSO; 10: SSS.

지의 용점에 영향을 받는 것으로 판단된다.

분별물에서 각 TAG의 가수분해율 비교

일반적으로 OOO의 용점은 0°C 이하, POS의 용점은 19.5~35.5°C로 알려져 있으며(31,32), 각 분별물에서 용점의 차이가 큰 OOO와 POS/PSO의 가수분해율(%)을 비교한 결과는 Fig. 5와 같다. 먼저 OOO(15.1 area%)와 POS/PSO(16.2 area%)의 조성이 유사한 I (Fig. 5-(I))에서는 반응시간(0, 15, 30, 60, 120분)이 증가함에 따라 가수분해율이 OOO 80.3~90.2%와 POS/PSO 79.4~91.2% 범위로 나타났으며, OOO가 약 6배 정도 더 함유되어 있는 II (Fig. 5-(II))에서는 OOO 77.4~91.9%, POS/PSO 74.2~91.5% 범위로 가수분해율이 나타나 유의적인 차이가 없음을 알 수 있었다. 또한 OOO에 비해 POS/PSO의 함량이 높은 III(약 9배, Fig. 5-(III))과 IV(약 2배, Fig. 5-(IV))에서 OOO와

POS/PSO의 가수분해율을 비교했을 때에도 유의적인 차이가 없었다. 반면 약 28배의 POS/PSO가 함유되어 있는 V (Fig. 5-(V))에서는 OOO와 POS/PSO의 가수분해율이 15분에서 46.4와 37.2%, 30분에서 48.9와 33.2%, 60분에서 44.1과 28.0%, 120분에서 69.5와 50.7%로 나타나 60분에서만 OOO가 가수분해율이 높은 것으로 나타났다. 이상의 결과를 종합해 본 결과, 반응시간(15, 30, 60, 120분)에 따라 OOO와 POS/PSO의 가수분해율을 비교하였을 때 각 TAG 간에 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났으며, 이는 각 TAG가 균질화되어 있기 때문에 상대적으로 고융점을 가진 TAG가 저융점을 가진 TAG에 영향을 끼쳐 나타난 결과인 것으로 판단된다. 한편 OOO에 비해 고융점인 POS/PSO의 함량이 많을수록 OOO와 POS/PSO 모두 가수분해율(%)이 낮아져 높은 융점을 가진 분별물일수록 *in vitro* digestion system에서의 가수분해율(%)이 낮은 것으로 확인되었다. 이는 총 지방산 조성에서의 포화지방산 함량이 증가하면서 한 개의 포화지방산으로 구성된 TAG보다 두 개의 포화지방산으로 구성된 TAG의 함량이 높아졌고, 이로 인해 융점이 증가하여(7) 가수분해율에 영향을 끼친 것으로 생각된다.

DSC를 이용한 흡열 및 발열곡선 분석

분별한 반응물들의 DSC를 통한 흡열 및 발열곡선을 분석한 결과는 Fig. 6과 같다. 모든 분별물들의 흡열곡선(Fig. 6-(A))은 높은 융점을 가진 peak를 나타내었으며, 31.9~50.6°C의 범위에서 확인되었다. 이는 반응물에 존재하는 DAG와 고융점의 TAG에 기인된 것으로 판단된다(29). 한편 Lipzyme RMIM 반응물(대칭형 유지; I, II, III)의 경우 분별을 진행하기 전(I, Fig. 6-I)의 흡열곡선은 8.0과 41.0°C에서, 발열곡선은 -44.7~10.9°C에서 peak를 나타내었으나, 분별 후 액체층(II, Fig. 6-II)의 흡열곡선은 -28.7~31.9°C에서, 발열곡선은 -44.1과 -4.9°C에서 peak를 나타내었다. 이는 고융점 TAG(ex. POP/PPO)보다 저융점 TAG(ex. POO/OPO)의 함량이 높아 이에 영향을 받은 것으로 판단된다(11). 반면 분별 후 고체층(III, Fig. 6-III)의 흡열곡선은 -25.3~45.3°C에서, 발열곡선은 -40.4~19.6°C에서 peak를 나타내어 흡열 피크는 융점이 높은 쪽으로, 발열 피크는 어는점이 높은 쪽으로 이동하는 것으로 분석되었다. 한편 Lipzyme TLIM 반응물(비대칭형 유지; IV, V)의 경우 다소 높은 온도에서 peak를 나타내는 경향이 있었다. PPP, PPS/PSP 등을 제거한 IV(Fig. 6-IV)의 흡열곡선은 -0.8~42.5°C 범위에서 peak를 나타내었으며, 높은 함량을 차지하고 있는 POS/PSO(22.9 area%)로 인해 14.5°C에서 가장 높은 peak를 나타내었다. 한편 고융점 TAG의 비율을 높인 V(Fig. 6-V)의 흡열곡선은 -3.9~50.6°C에서 peak를 나타내었으며, IV와 마찬가지로 POS/PSO로 인해 24.3°C에서 가장 높은 peak를 나타내었다. 또한 각 분별물의 흡열곡선(Fig. 6-(A))에서 나타나는 가장 높은 피크를

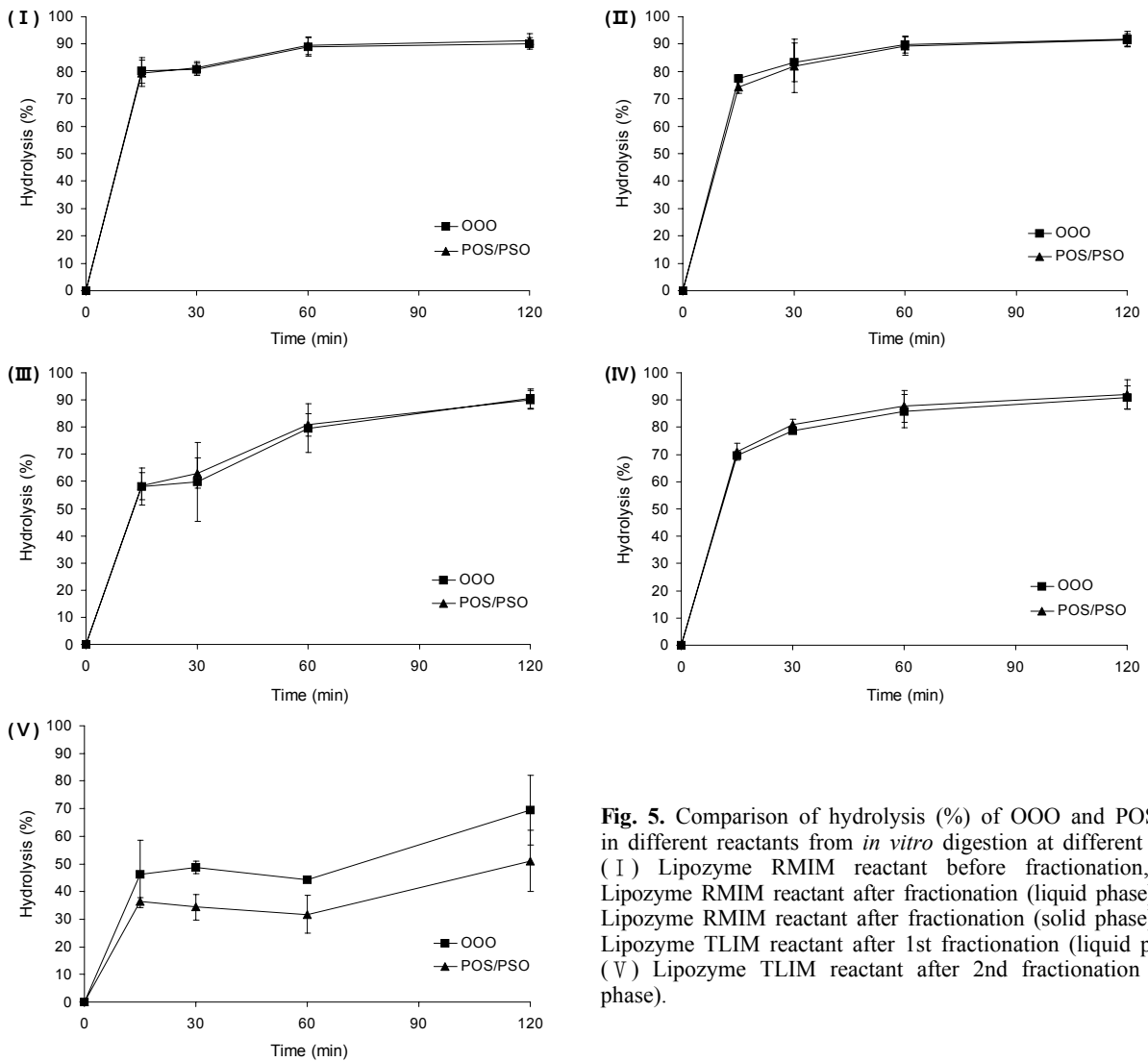


Fig. 5. Comparison of hydrolysis (%) of OOO and POS/PSO in different reactants from *in vitro* digestion at different times. (I) Lipozyme RMIM reactant before fractionation, (II) Lipozyme RMIM reactant after fractionation (liquid phase), (III) Lipozyme RMIM reactant after fractionation (solid phase), (IV) Lipozyme TLIM reactant after 1st fractionation (liquid phase), (V) Lipozyme TLIM reactant after 2nd fractionation (solid phase).

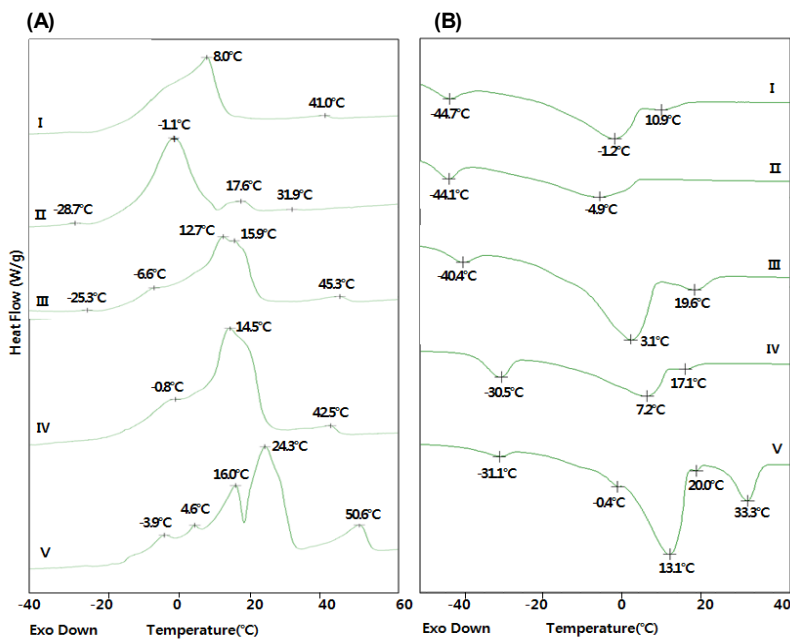


Fig. 6. Melting curves (A) and crystallization curves (B) of reactants (HOSO : PEE : StEE= 1:1:1) removed ethyl ester and fractionated after different enzyme reactions. I, Lipozyme RMIM reactant before fractionation; II, Lipozyme RMIM reactant after fractionation (liquid phase); III, Lipozyme RMIM reactant after fractionation (solid phase); IV, Lipozyme TLIM reactant after 1st fractionation (liquid phase); V, Lipozyme TLIM reactant after 2nd fractionation (solid phase). ¹⁾Molar ratio.

Table 4. Solid fat index (%), slip melting points and complete melting points of reactants (HOSO¹⁾: PEE²⁾: SEE³⁾=1:1:1⁴⁾) removed ethyl ester and fractionated from acetone

Temp. (°C)	Lipozyme RMIM			Lipozyme TLIM	
	Before (I)	After Liquid phase (II)	After Solid phase (III)	1st fractionation (IV)	2nd fractionation (V)
0	53.8	32.0	73.1	80.4	89.3
5	27.3	16.1	58.2	69.8	83.1
10	14.2	8.2	37.6	56.5	75.9
15	3.6	5.2	9.4	17.0	64.0
20	1.5	1.0	3.4	5.4	51.8
25	1.1	0.3	2.9	4.0	31.2
30	1.1	0.2	2.9	3.5	13.1
35	0.8	0.0	2.8	3.1	10.5
37	0.6	0.0	2.6	2.7	10.4
40	0.0	0.0	2.1	1.9	9.8
Slip melting point (°C)	13.0±1.4	—	31.3±1.1	19.5±0.7	41.5±0.7
Complete melting point (°C)	18.5±0.7	—	32.5±0.7	31.8±1.8	49.0±0.0

¹⁾HOSO: high oleic sunflower oil. ²⁾PEE: palmitic ethyl ester. ³⁾SEE: stearic ethyl ester. ⁴⁾Molar ratio.

온도 순서대로 나열하면 II -1.1°C, I 8.0°C, III 12.7°C, IV 14.5°C, V 24.3°C의 순서로 나타났으며, 두 개의 포화지방산으로 구성된 TAG의 함량이 많을수록 높은 온도에서 피크가 나타나는 것을 알 수 있었다. 그러나 IV가 III에 비해 두 개의 포화지방산으로 구성된 TAG(POS/PSO, SOS/SSO)를 약 33 area% 정도 적게 함유하고 있으나 유사한 흡열곡선 및 발열곡선을 나타내는 것으로 보아 비대칭형 TAG가 더 높은 용점을 나타내는 것으로 판단된다.

Slip melting point, complete melting point와 solid fat index 분석

각 분별물들의 slip melting point(slip m.p), complete melting point(complete m.p) 및 solid fat index(SFI)를 분석한 결과는 Table 4와 같으며, 37°C에서의 SFI는 V (10.4%), IV(2.7%), III(2.6%), I (0.6%), 그리고 II(0.0%) 순으로 나타나 초기(15, 30, 60분) 가수분해율 결과와 유사함을 알 수 있었다. 한편 용점 분석 결과, Lipozyme RMIM 반응물(대칭형 유지; I, II, III)의 경우 분별을 진행하기 전(I)의 complete m.p와 slip m.p는 18.5와 13.0°C, 분별 후 액체층(II)은 -20°C의 온도에서 굳지 않아 측정 불가하였으며, 분별 후 고체층(III)은 32.5와 31.3°C로 나타났다. 이를 통해 두 개의 포화지방산으로 구성된 TAG(ex. POP/PPO)의 함량이 많을수록 높은 용점을 가지는 것을 알 수 있었으며(7), 용점이 가수분해율에 영향을 끼치는 것으로 생각된다. 한편 Lipozyme TLIM 반응물(비대칭형 유지; IV, V)의 경우 1st fractionation을 진행한 후(IV)의 complete m.p와 slip m.p는 31.8과 19.5°C, 2nd fractionation을 진행한 후(V)는 49.0과 41.5°C로 나타나 Lipozyme RMIM 반응물과 마찬가지로 고용점의 TAG의 함량이 높아질수록 높은 용점을 나타내는 것으로 확인되었으며, 특히 V의 용점은 *in vitro* digestion 반응온도(37°C)보다 높아 소화 시스템 안에서 분별물이 녹지 않았기 때문에 V의 소화율이 낮았

던 것으로 생각된다. 또한 분별물의 소화율이 낮은 순서와 complete m.p가 높은 순서가 일치하는 것을 알 수 있었으나, III과 IV의 경우 slip m.p에서 차이가 있고 complete m.p는 유사한 것을 알 수 있었다. 이는 III은 포화지방산이 한 개로 구성된 TAG(ex. POO/OPO)의 함량(21.8 area%)이 적고, 포화지방산이 두 개로 구성된 TAG(70.5 area%)가 대칭형으로 이루어져 있어 용점이 낮기 때문에 slip m.p와 complete m.p가 31.3과 32.5°C로 큰 차이를 나타내지 않은 것으로 생각된다. 반면 비대칭형의 IV는 한 개의 포화지방산으로 구성된 TAG(46.0 area%)와 두 개의 포화지방산으로 구성된 TAG(36.7 area%)의 함량이 유사하면서도 용점의 차이가 커 slip m.p와 complete m.p가 19.5와 31.8°C로 나타난 것으로 판단되며, 유지의 가수분해율에는 complete m.p보다 slip m.p가 가장 큰 영향을 끼치는 것을 알 수 있었다.

요 약

본 연구는 고올레산 해바라기유(high oleic sunflower oil, HOSO), palmitic ethyl ester 및 stearic ethyl ester를 이용하여 대칭형 유지와 비대칭형 유지를 합성하였으며, 이를 이용하여 *in vitro* digestion에서의 소화율(%)을 비교하고자 하였다. 생성된 대칭형 유지와 비대칭형 유지는 acetone을 이용하여 분별함으로써 대칭형 유지는 I, II, III으로, 비대칭형 유지는 IV, V로 분별되었다. 그 후 분별물들을 이용하여 *in vitro* digestion을 진행함으로써 소화율(%)과 농도변화량(mg/mL/min)을 비교하였으며, 분별물들의 위치별 지방산 및 TAG 조성 분석, DSC를 통한 흡열 및 발열곡선 분석, solid fat index와 용점 측정을 통해 특성을 알아보고자 하였다. 위치별 지방산 조성 분석 결과 I, II, III은 sn-2 위치에 palmitic acid와 stearic acid의 함이 4.9~6.5 area%로 나타나 주로 대칭형 TAG로 이루어졌고, IV와 V

는 41.9~43.9 area%로 나타나 주로 비대칭형 TAG로 구성되어 있는 것으로 확인되었다. 한편 *in vitro* digestion을 진행하여 분별물간의 가수분해율(%)을 비교한 결과, 반응 시간 120분에서는 V만 다른 분별물에 비해 약 40% 정도 소화가 되지 않았으며, V의 용점이 49°C로 반응온도(37°C)보다 높았다. 초기 반응시간(15분)에서는 I, II > IV > III > V 순으로 소화가 되지 않았으며, 각 분별물에서 OOO와 POS/PSO의 가수분해율(%)을 비교해 본 결과 TAG 간의 가수분해율 차이가 없는 것으로 나타났다. 한편 III과 IV를 비교해 보았을 때, IV가 III에 비해 두 개의 포화지방산으로 구성된 TAG 함량이 약 40 area% 적지만 complete melting point가 III과 유사한 것으로 나타나 비대칭형 TAG가 대칭형 TAG에 비해 용점이 높다는 것을 알 수 있었다. 따라서 slip melting point가 *in vitro* digestion 결과에 가장 큰 영향을 미치며, 용점은 총지방산 조성에서의 포화지방산 함량이 높을수록, 두 개의 포화지방산으로 구성된 TAG의 함량이 높을수록, 비대칭형 TAG로 이루어질수록 높아짐을 알 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 충남대학교 학술연구비에 의해 지원되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Poulain JP. 2002. The contemporary diet in France: "de-structuring" or from commensalism to "vagabond feeding". *Appetite* 39: 43-55.
- Anderson AS, Macintyre S, West P. 1993. Adolescent meal patterns: grazing habits in the west of Scotland. *Health Bull* 51: 158-165.
- Kim K, Park E. 2005. Nutrient density of fast-food consumed by the middle school students in Cheongju city. *Korean J Community Nutr* 10: 271-280.
- Akoh CC. 2002. *Food Lipids*. 2nd ed. Marcel Dekker, Inc., New York, NY, USA. p 713-745.
- Moon HN, Hong SJ, Suh SJ. 1992. The prevalence of obesity in children and adolescents. *Korean J Nutr* 25: 413-418.
- Ahn HS, Park JK, Lee DH, Paik IK, Lee JH, Lee YJ. 1994. Clinical and nutritional examination in obese children and adolescents. *Korean J Nutr* 27: 79-89.
- Arishima T, Tachibana N, Kojima M, Takamatsu K, Imaizumi K. 2009. Screening of resistant triacylglycerols to the pancreatic lipase and their potentialities as a digestive retardant. *J Food Lipids* 16: 72-88.
- Lee KT, Akoh CC. 1998. Structure lipids: synthesis and applications. *Food Rev Int* 14: 17-34.
- Lee KT, Foglia TA, Lee JH. 2005. Low-calorie fat substitutes: synthesis and analysis. In *Handbook of Industrial Biocatalysis*. Hou CT, ed. CRC Press, Boca Raton, FL, USA. Vol 16, p 1-19.
- Moon JH, Lee JH, Shin JA, Hong ST, Lee KT. 2011. Optimization of lipase-catalyzed production of structured lipids from canola oil containing similar composition of triacylglycerols to cocoa butter. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40: 1490-1437.
- Lee YJ, Lee KT. 2009. Development and characterization of *trans* free margarine stock from lipase-catalyzed interesterification of avocado and palm oils. *Korean J Food Sci Technol* 41: 231-237.
- Son JM, Lee JH, Xue CL, Hong ST, Lee KT. 2011. Optimization of lipase-catalyzed interesterification for production of human milk fat substitutes by response surface methodology. *Korean J Food Sci Technol* 43: 689-695.
- Xu X, Skands ARH, Hoy CE, Mu H, Balchen S, Nissen JA. 1998. Production of specific-structured lipids by enzymatic interesterification: Elucidation of acyl migration by response surface design. *J Am Oil Chem Soc* 75: 1179-1186.
- Mu H, Hoy CE. 2004. The digestion of dietary triacylglycerols. *Prog Lipid Res* 43: 105-133.
- Griffin BA. 2013. Lipid metabolism. *Surgery* 31: 267-272.
- Versantvoort CHM, Oomen AG, Kamp EVD, Rompelberg CJM, Sips AJAM. 2005. Applicability of an *in vitro* digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. *Food Chem Toxicol* 43: 31-40.
- Mun S, Decker EA, Park Y, Weiss J, McClements DJ. 2006. Influence of interfacial composition on *in vitro* digestibility of emulsified lipids: potential mechanism for chitosan's ability to inhibit fat digestion. *Food Biophysics* 1: 21-29.
- Cai S, Wang O, Wang M, He J, Wang Y, Zhang D, Zhou F, Ji B. 2012. *In vitro* inhibitory effect on pancreatic lipase activity of subfractions from ethanol extracts of fermented oats (*Avena sativa* L.) and synergistic effect of three phenolic acids. *J Agric Food Chem* 60: 7245-7251.
- Pafumi Y, Lairon D, de la Porte PL, Juhel C, Storch J, Hamosh M, Armand M. 2002. Mechanisms of inhibition of triacylglycerol hydrolysis by human gastric lipase. *J Biol Chem* 277: 28070-28079.
- Oomen AG, Rompelberg CJM, Bruil MA, Dobbe CJG, Pereboom DPKH, Sips AJAM. 2003. Development of an *in vitro* digestion model for estimating the bioaccessibility of soil contaminants. *Arch Environ Contam Toxicol* 44: 281-287.
- Nakai M, Fukui Y, Asami S, Toyoda-Ono Y, Iwashita T, Shibata H, Mitsunaga T, Hashimoto F, Kiso Y. 2005. Inhibitory effect of oolong tea polyphenols on pancreatic lipase *in vitro*. *J Agric Food Chem* 53: 4593-4598.
- Ronne TH, Yang T, Mu H, Jacobsen C, Xu X. 2005. Enzymatic interesterification of butterfat with rapeseed oil in a continuous packed bed reactor. *J Agric Food Chem* 53: 5617-5624.
- Lee KT, Foglia TA. 2000. Fractionation of chicken fat triacylglycerols: synthesis of structured lipids with immobilized lipases. *J Food Sci* 65: 826-831.
- Christie WW. 1982. *Lipid analysis: isolation, separation, identification, and structural analysis of lipids*. Pergamon Press, Oxford, UK. p 96-98.
- Hyeon JW, Shin JA, Lee KT. 2013. Fatty acid composition and triacylglycerol species of the domestic and foreign chocolates collected from the market. *CNU Journal of Agricultural Science* 40: 35-45.
- Lee KT, Foglia TA. 2001. Fractionation of menhaden oil and partially hydrogenated menhaden oil: characterization of triacylglycerol fractions. *J Am Oil Chem Soc* 78: 297-304.
- 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.
- AOCS. 1990. *Official Method and Recommended Practices*. 4th ed. American Oil Chemists' Society, Champaign, IL,

- USA. Cc 1-25.
29. Kim JY, Lee KT. 2014. Enzymatic interesterification and melting characteristic for asymmetric 1,2-distearoyl-3-oleoyl-rac-glycerol triacylglycerol enriched product. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43: 93-101.
 30. Hyeon JW, Lee KT. 2013. Enzymatic synthesis of asymmetric structured lipids containing 1,2-disaturated-3-unsaturated glycerol using acyl migration. *CNU Journal of Agricultural Science* 40: 367-375.
 31. Arishima T, Tachibana N, Kojima M, Takamatsu K, Imaizumi K. 2009. Screening of resistant triacylglycerols to the pancreatic lipase and their potentialities as a digestive retardant. *J Food Lipids* 16: 72-88.
 32. Arishima T, Sagi N, Mori H, Sato K. 1991. Polymorphism of POS. 1. Occurrence and polymorphic transformation. *J Am Oil Chem Soc* 68: 710-715.