



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0075971
(43) 공개일자 2020년06월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C11C 3/10 (2006.01) C11C 3/08 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C11C 3/10 (2013.01)
C11C 3/08 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0164023
(22) 출원일자 2018년12월18일
심사청구일자 2018년12월18일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
이기택
대전광역시 유성구 어은로 57 107동 1204호 (어은동, 한빛아파트)
신정아
대구광역시 동구 계족로 116-2
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이원희

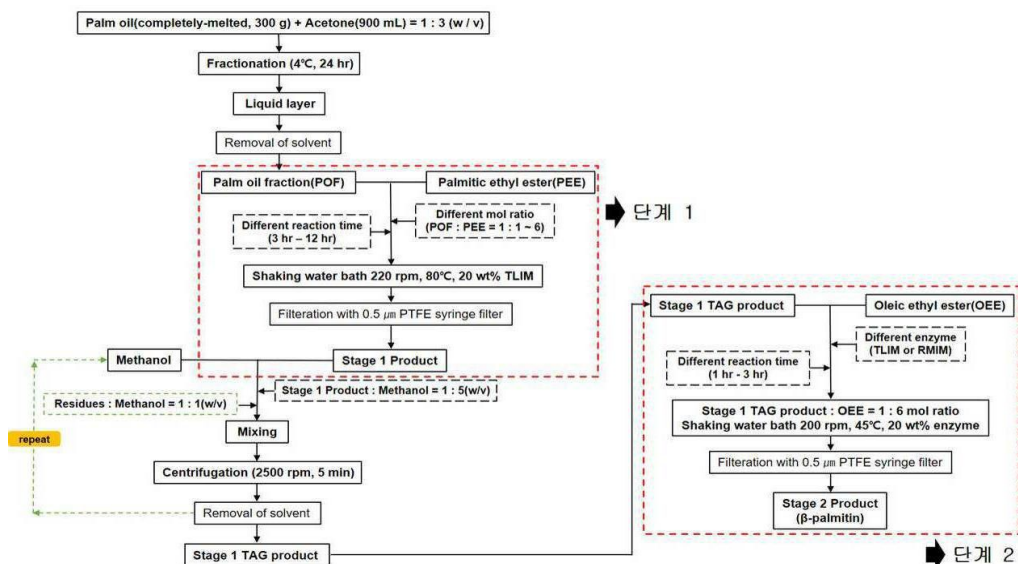
전체 청구항 수 : 총 23 항

(54) 발명의 명칭 식물유 내 sn-2 위치에 포화지방산을 갖는 트리글리세라이드의 함량을 증가시키는 방법 및 sn-2 위치에 불포화지방산을 갖는 트리글리세라이드를 sn-2 위치에 포화지방산을 갖는 트리글리세라이드로 전환시키는 방법

(57) 요약

본 발명은 식물유 내 sn-2 위치에 포화지방산을 갖는 트리글리세라이드의 함량을 증가시키는 방법 및 sn-2 위치에 불포화지방산을 갖는 트리글리세라이드를 sn-2 위치에 포화지방산을 갖는 트리글리세라이드로 전환시키는 방법에 관한 것으로, 상기 방법들은 에스테르 교환반응 및 아실 마이그레이션이 일어나는 단계 1 및 에스테르 교환반응이 일어나는 단계 2를 포함함으로써, sn-2 위치에 불포화지방산을 갖는 트리글리세라이드를 높은 전환율로 sn-2 위치에 포화지방산을 갖는 트리글리세라이드로 전환시켜, 요오드가 높은 식물유로부터 sn-2 위치에 포화지방산을 갖는 β -palmitin 형태의 모유대체유지를 제조할 수 있다.

대표도



(72) 발명자

홍순택

대전광역시 서구 복수동로 21-19 에미지아파트 10
7동 802호

이정희

경상북도 경산시 하양읍 하양로 37길 33 코아루아
파트 3차 302동 1205호

권혁준

충청남도 서산시 남부순환로 767, 113동 1002호

명세서

청구범위

청구항 1

식물유와 포화 지방산 알킬 에스테르를 Lipase존재하에 반응시키는 단계(단계 1); 및

상기 단계 1의 반응 결과물과 불포화 지방산 알킬 에스테르를 Lipase존재하에 반응시키는 단계(단계 2)를 포함하는,

식물유 내 sn-2 위치에 포화지방산을 갖는 트리글리세라이드의 함량을 증가시키는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 방법은 식물유 내 sn-2 위치에 불포화지방산을 갖는 트리글리세라이드를 sn-2 위치에 포화지방산을 갖는 트리글리세라이드로 전환시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 단계 1의 Lipase는 sn-1,3 specific lipase로서, Lipozyme TLIM (Thermomyces lanuginosus)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 단계 2의 Lipase는 sn-1,3 specific lipase로서, Lipozyme TLIM (Thermomyces lanuginosus) 또는 Lipozyme RMIM (Rhizomucor miehei)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 식물유는 IV(iodine value)가 45-65인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 단계 1은 에스테르 교환반응 및 아실 마이그레이션(acyl migration)반응이 일어나는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 아실 마이그레이션에 의해 식물유 내 트리글리세라이드의 sn-2 위치의 불포화지방산이 포화지방산으로 전

환되는 것을 특징으로 하는 방법

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 단계 2는 에스테르 교환반응이 일어나는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 단계 1의 포화 지방산 알킬 에스테르의 포화지방산은 팔미트산(palmitic acid), 미리스트산(myristic acid) 또는 스테아르산(stearic acid)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제1항에 있어서,

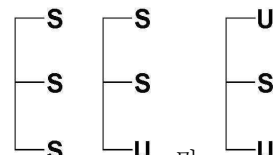
상기 단계 2의 불포화 지방산 알킬 에스테르의 불포화 지방산은 올레산(oleic acid) 또는 리놀레산(linoleic acid)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제1항의 방법에 따라 제조된 sn-2 위치에 포화지방산을 갖는 트리글리세라이드의 함량이 증가된 식물유.

청구항 12

제11항에 있어서,

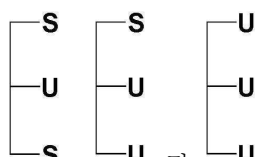


상기 sn-2 위치에 불포화지방산을 갖는 트리글리세라이드는, , 및 로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 이들의 혼합인 것을 특징으로 하는 식물유:

(상기 화학식에서, S는 포화 지방산이고, U는 불포화 지방산이다).

청구항 13

제11항에 있어서,



상기 식물유는, , 및 로 이루어지는 군으로부터 선택되는 트리글리세라이드를 하나 이상 더 포함할 수 있는 것을 특징으로 하는 식물유:

(상기 화학식에서, S는 포화 지방산이고, U는 불포화 지방산이다).

청구항 14

sn-2 위치에 불포화지방산을 갖는 트리글리세라이드와 포화 지방산 알킬 에스테르를 Lipase존재하에 반응시키는 단계(단계 1); 및

상기 단계 1의 반응 결과물과 불포화 지방산 알킬 에스테르를 Lipase존재하에 반응시키는 단계(단계 2)를 포함하는,

sn-2 위치에 불포화지방산을 갖는 트리글리세라이드를 sn-2 위치에 포화지방산을 갖는 트리글리세라이드로 전환시키는 방법.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 단계 1의 sn-2 위치에 불포화지방산을 갖는 트리글리세라이드는 팜유로부터 분획된 분획물인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

제14항에 있어서,

상기 단계 1의 Lipase는 sn-1,3 specific lipase로서, Lipozyme TLIM (*Thermomyces lanuginosus*)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

제14항에 있어서,

상기 단계 2의 Lipase는 sn-1,3 specific lipase로서, Lipozyme TLIM (*Thermomyces lanuginosus*) 또는 Lipozyme RMIM (*Rhizomucor miehei*)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 18

제14항에 있어서,

상기 단계 1의 sn-2 위치에 불포화지방산을 갖는 트리글리세라이드는 IV(iodine value)가 55-75인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 19

제14항에 있어서,

상기 단계 1은 에스테르 교환반응 및 아실 마이그레이션(acyl migration)반응이 일어나는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 20

제19항에 있어서,

상기 아실 마이그레이션에 의해 트리글리세라이드의 sn-2 위치의 불포화지방산이 포화지방산으로 전환되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 21

제14항에 있어서,

상기 단계 2는 에스테르 교환반응이 일어나는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 22

제14항에 있어서,

상기 단계 1의 포화 지방산 알킬 에스테르의 포화지방산은 팔미트산(palmitic acid)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 23

제14항에 있어서,

상기 단계 2의 불포화 지방산 알킬 에스테르의 불포화 지방산은 올레산(oleic acid)인 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 식물유 내 sn-2 위치에 포화지방산을 갖는 트리글리세라이드의 함량을 증가시키는 방법 및 sn-2 위치에 불포화 지방산을 갖는 트리글리세라이드를 sn-2 위치에 포화지방산을 갖는 트리글리세라이드로 전환시키는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 모유는 영아가 가장 처음으로 접하는 영양원으로서 탄수화물(6.9-7.2%), 지질(3-5%), 단백질(0.8-0.9%), 미네랄(0.2%) 및 비타민 등으로 이루어진 완전식품이다. 이 중에서도 모유 지방은 모유로부터 제공되는 열량의 50% 이상을 차지하기 때문에 소화율과 흡수율이 제한적인 영아들에게 중요한 영양공급원으로 작용한다.

[0004] 모유의 주요 지방산은 불포화 지방산인 올레산(oleic acid)(28-43%), 리놀레산(linoleic acid)(10-25%), 포화 지방산인 팔미트산(palmitic acid)(15-25%), 미리스트산(myristic acid)(3-12%), 스테아르산(stearic acid)(4-8%)이며 이외 소량의 중쇄지방산(caprylic acid, capric acid)과 다가불포화지방산(arachidonic acid, eicosapentaenoic acid, docosahexaenoic acid)이 적은 양으로 존재한다.

[0006] 특히 모유 지방의 트리글리세라이드(triglyceride, TG, triacylglycerol, TAG, triacylglyceride) 내 sn-2(fatty acid position 2) 위치의 지방산 분포는 70% 이상이 포화지방산이고 이 중의 많은 부분을 palmitic acid(C_{16:0}, P)가 차지하고 있는 반면, sn-1, 3 위치에는 oleic acid(C_{18:1}, O)와 linoleic acid(C_{18:2}, L)와 같은 불포화지방산이 주를 이루기 때문에 모유 지방의 주요 TAG 종류는 1,3-dioleoyl-2-palmitoylglycerol(OPO)과 1-oleoyl-2-palmitoyl-3-linoleoylglycerol(OPL)이다. 이와 같이 모유 지방은 sn-2 위치에 palmitic acid를 다량 함유하고 있는 β-palmitin 형태이기 때문에 sn-2 위치의 대부분이 불포화지방산으로 이루어져 있는 식물성유와 확연한 차이를 보인다.

[0008] Pancreatic lipase와 TAG가 반응하면 효소의 기질특이성에 따라 TAG 내 *sn*-1, 3 위치에 있는 지방산이 유리지방산으로 가수분해되면서 2-monoacylglycerol(MAG)을 생성하게 된다. 2-MAG의 경우 bile salts에 의해 micelle 구조를 이루면서 지방산의 종류와 상관없이 소장 상피세포 안으로 흡수되어 에너지원으로 쉽게 이용된다. 그러나 가수분해된 유리지방산은 탄소수 길이와 불포화도에 따라 체내 흡수율이 다른 양상을 보인다.

[0010] 가수분해된 유리지방산이 포화지방산이면서 중쇄지방산 이상의 탄소수 길이를 가지는 palmitic acid일 때, pH 7 이상의 알칼리 조건에서 Ca^{2+} , Mg^{2+} 과 같은 2가의 양이온과 결합하여 불용성염을 형성하기 때문에 palmitic acid와 mineral의 흡수율이 감소하게 되고 변비를 유발하게 된다. 반대로 모유 지방의 주요 TAG 형태인 β -palmitin의 경우, pancreatic lipase에 의해 *sn*-1, 3 위치의 지방산이 가수분해되면서 2-MAG 형태의 palmitic acid가 소장 상피세포 안으로 흡수되어 에너지원으로 이용되며 가수분해된 oleic acid는 2가의 양이온과 염을 형성한다. 이때 생기는 염은 불용성 염보다 상대적으로 체내 흡수율이 높아 지방과 미네랄의 이용률이 증가하게 되어 영아의 성장에 긍정적으로 작용한다.

[0012] 모유대체유지의 합성 방법은 효소적 에스테르 교환반응을 기초로 하여 acidolysis, esterification, glycerolysis 및 alcoholysis 반응 등을 다양하게 이용할 수 있는데, 이렇게 합성된 모유대체유지는 TAG의 분자 구조에 따라 지질의 소화, 흡수 및 물리적 특성이 결정된다.

[0014] 효소적 에스테르 교환반응에서 나타나는 lipase의 반응은 acylglycerol의 가수분해와 에스테르 결합의 가역적 반응이지만, 물의 양이 제한되는 조건에서는 acylglycerol의 가수분해가 최소화되기 때문에 lipase에 의한 에스테르 교환반응이 지배적으로 일어나게 된다. 또한 사용되는 고정화 효소(immobilized enzyme)는 소수성 또는 친수성 지지체에 효소를 고정화시킴으로써 온도와 pH에 대한 안정성을 높이고 부산물을 적게 만드는 장점이 있다. 여기에 효소의 재사용 가능성에 의한 생산비용 절감효과와 공정을 조절하기 쉬운 특징으로 인해 산업적으로 유용하게 이용되고 있다.

[0016] 일반적으로 사용되는 모유대체유지 제조과정은 다량의 palmitic acid로 구성되어 요오드가가 낮은 유지 (일반적으로 30 이하)와 oleic acid 또는 그의 ester를 기질로 하여 TAG 내 *sn*-1, 3 위치에 선택적으로 작용하는 효소를 반응 촉매로 이용하는 것인데, 효소의 위치 특이성으로 인해 TAG 반응물 내 *sn*-2 위치의 지방산이 대부분 보존되어 β -palmitin 형태를 합성하는 것이다. 이를 위해서 주로 이용되는 기질은 tripalmitin의 함량이 높은 PS나 팜유 분획 혼합물이다.(WO 2006114791 A1; EP 0496456 A1; WO 1994026855 A1; Lee et al., New Biotechnology, 27:38-45, 2010; Sahin et al., J. Agric. Food Chem., 53:5779-5783, 2005)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0018] 본 발명의 일 목적은 *sn*-2 위치에 포화 지방산을 가지는 β -palmitin 형태의 모유대체유지의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0020] 본 발명의 다른 목적은 식물유 내 *sn*-2 위치에 포화지방산을 갖는 트리글리세라이드의 함량을 증가시키는 방법을 제공하는 것이다.

[0022] 본 발명의 다른 목적은 상기 방법에 따라 제조된 *sn*-2 위치에 포화지방산을 갖는 트리글리세라이드의 함량이 증가된 식물유를 제공하는 것이다.

[0024] 본 발명의 다른 목적은 sn-2 위치에 불포화지방산을 갖는 트리글리세라이드를 sn-2 위치에 포화지방산을 갖는 트리글리세라이드로 전환시키는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0026] 상기 목적을 달성하기 위하여,

[0027] 본 발명의 일 측면에 따라,

[0028] 식물유와 포화 지방산 알킬 에스테르를 Lipase존재하에 반응시키는 단계(단계 1); 및

[0029] 상기 단계 1의 반응 결과물과 불포화 지방산 알킬 에스테르를 Lipase존재하에 반응시키는 단계(단계 2)를 포함하는,

[0030] 식물유 내 sn-2 위치에 포화지방산을 갖는 트리글리세라이드의 함량을 증가시키는 방법이 제공된다.

[0032] 본 발명의 다른 측면에 따라, 상기 방법에 따라 제조된 sn-2 위치에 포화지방산을 갖는 트리글리세라이드의 함량이 증가된 식물유가 제공된다.

[0034] 본 발명의 다른 측면에 따라,

[0035] sn-2 위치에 불포화지방산을 갖는 트리글리세라이드와 포화 지방산 알킬 에스테르를 Lipase존재하에 반응시키는 단계(단계 1); 및

[0036] 상기 단계 1의 반응 결과물과 불포화 지방산 알킬 에스테르를 Lipase존재하에 반응시키는 단계(단계 2)를 포함하는,

[0037] sn-2 위치에 불포화지방산을 갖는 트리글리세라이드를 sn-2 위치에 포화지방산을 갖는 트리글리세라이드로 전환시키는 방법이 제공된다.

발명의 효과

[0039] 본 발명의 식물유 내 sn-2 위치에 포화지방산을 갖는 트리글리세라이드의 함량을 증가시키는 방법 및 sn-2 위치에 불포화지방산을 갖는 트리글리세라이드를 sn-2 위치에 포화지방산을 갖는 트리글리세라이드로 전환시키는 방법은 에스테르 교환반응 및 아실 마이그레이션이 일어나는 단계 1 및 에스테르 교환반응이 일어나는 단계 2를 포함함으로써, sn-2 위치에 불포화지방산을 갖는 트리글리세라이드를 높은 전환율로 sn-2 위치에 포화지방산을 갖는 트리글리세라이드로 전환시켜, 요오드가 높은 식물유로부터 sn-2 위치에 포화지방산을 갖는 β -palmitin 형태의 모유대체유지를 제조할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0041] 도 1은 본 발명의 팜유를 출발물질로 하여, 분획하고, 분획물과 PEE를 Lipase존재하에 반응시키는 단계(단계 1); 및 상기 단계 1의 반응 결과물과 OEE를 Lipase존재하에 반응시키는 단계(단계 2)를 실시예 수준으로 반응 과정을 나타낸 모식도이다.

도 2는 발명의 sn-2 위치에 불포화지방산을 갖는 트리글리세라이드를 sn-2 위치에 포화지방산을 갖는 트리글리세라이드로 전환시켜, 팜유 분획물(Palm oil fraction, POF)로부터 β -palmitin 형태의 모유대체유지를 제조하는 방법을 트리글리세라이드의 화학구조식으로 나타낸 화학반응식이다. P: 팔미트산(palmitic acid) 에스테르, O: 올레산(Oleic acid) 에스테르, P/O 또는 O/P: 해당 지방산 위치가 팔미트산 에스테르인 트리글리세라이드 또는 올레산 에스테르인 트리글리세라이드가 모두 존재하는 상태이다.

도 3은 Ag-HPLC로 분석된 기질의 크로마토그램을 나타낸 것이다(S=포화 지방산, U=불포화 지방산). A) Palm oil, B) Palm oil fraction(실시예 1의 단계 1에서 분획한 팜유 분획물), C) Palmitic ethyl ester, D) Oleic ethyl ester

도 4는 실시예 SL1-1 내지 SL1-12의 반응 생성물에 대한 Ag-HPLC로 분석된 기질의 크로마토그램을 나타낸 것이다.

도 5는 실시예 SL2-1 내지 SL2-4의 반응 생성물에 대한 Ag-HPLC로 분석된 기질의 크로마토그램을 나타낸 것이다. A) SL2-1 (20 wt% TLIM, 1 hr, 1 : 6 mol ratio, 45°C, 200 rpm), B) SL2-2 (20 wt% TLIM, 3 hr, 1 : 6 mol ratio, 45°C, 200 rpm), C) SL2-3 (20 wt% RMIM, 1 hr, 1 : 6 mol ratio, 45°C, 200 rpm), D) SL2-4 (20 wt% RMIM, 3 hr, 1 : 6 mol ratio, 45°C, 200 rpm)

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0042] 본 발명의 일 목적은 sn-2 위치에 포화 지방산을 가지는 β -palmitin 형태의 모유대체유지의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0043] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 식물유 내 sn-2 위치에 포화지방산을 갖는 트리글리세라이드의 함량을 증가시키는 방법 및 sn-2 위치에 불포화지방산을 갖는 트리글리세라이드를 sn-2 위치에 포화지방산을 갖는 트리글리세라이드로 전환시키는 방법을 제공한다.
- [0044] 상기 방법들을 통하여 sn-2 위치에 포화 지방산을 가지는 β -palmitin 형태의 모유대체유지를 제조할 수 있다.
- [0046] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0048] 본 발명의 일 측면은,
- [0049] 식물유와 포화 지방산 알킬 에스테르를 Lipase존재하에 반응시키는 단계(단계 1); 및
- [0050] 상기 단계 1의 반응 결과물과 불포화 지방산 알킬 에스테르를 Lipase존재하에 반응시키는 단계(단계 2)를 포함하는,
- [0051] 식물유 내 sn-2 위치에 포화지방산을 갖는 트리글리세라이드의 함량을 증가시키는 방법을 제공한다.
- [0053] 이하, 상기 식물유 내 sn-2 위치에 포화지방산을 갖는 트리글리세라이드의 함량을 증가시키는 방법을 상세히 설명한다.
- [0055] 상기 방법은 식물유 내 sn-2 위치에 불포화지방산을 갖는 트리글리세라이드를 sn-2 위치에 포화지방산을 갖는 트리글리세라이드로 전환시킴으로써, 식물유 내 sn-2 위치에 포화지방산을 갖는 트리글리세라이드의 함량이 증가된다.
- [0057] 상기 식물유는 IV(iodine value)가 45-65으로, 높은 IV값을 나타내며, 원유(raw oil) 또는 원유를 분획한 분획물을 모두 포함하는 개념이다.

- [0058] 또한, 상기 식물유는
- S

—

U

—

S

또는

S

—

U

—

U

형태의 트리글리세라이드를 많이 포함하고 있으며,

S

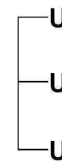
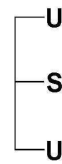
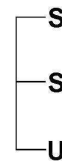
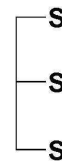
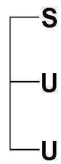
—

U

—

S

를 30-40%,



를 40-50%의 함량으로 포함할 수 있다. 또한, 상기 식물유는 군으로부터 선택되는 트리글리세라이드를 하나 이상 더 포함할 수 있다.

[0059] 상기 트리글리세라이드의 화학식에서, S는 포화 지방산이고, U는 불포화 지방산이다. 또한, 상기 포화 지방산은 팔미트산(palmitic acid), 미리스트산(myristic acid), 또는 스테아르산(stearic acid)일 수 있다. 상기 불포화 지방산은 올레산(oleic acid) 또는 리놀레산(linoleic acid)일 수 있다.

[0061] 상기 단계 1의 Lipase는 sn-1,3 specific lipase로서, Lipozyme TLIM (Thermomyces lanuginosus)일 수 있다.

[0062] 상기 단계 1은 에스테르 교환반응 및 아실 마이그레이션(acyl migration)반응이 일어나는 단계로, 식물유 내 트리글리세라이드의 sn-1, sn-3 위치의 지방산이 포화 지방산 알킬 에스테르의 포화지방산과 에스테르 교환반응하여, sn-1 또는 sn-3에 포화지방산을 가지는 트리글리세라이드의 함량이 늘어나고, 아실 마이그레이션으로 인해 sn-2 위치의 불포화지방산이 sn-1 또는 sn-3의 포화지방산으로 전환된다.

[0064] 상기 단계 1 수행 후, 식물유 전체에 대하여 sn-2가 포화지방산인 트리글리세라이드를 40%이상 포함할 수 있다.

[0065] 이때, 상기 단계 1의 포화 지방산 알킬 에스테르의 포화지방산은 팔미트산(palmitic acid), 미리스트산(myristic acid), 또는 스테아르산(stearic acid)일 수 있다. 상기 알킬은 직쇄 또는 분지쇄의 C₁₋₁₀알킬일 수 있고, 에틸일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 팔미틱 에틸 에스테르(palmitic ethyl ester, PEE)를 사용하였으나, 이는 일례일 뿐 이에 한정되는 것은 아니다.

[0066] 상기 단계 1에서, 포화 지방산 알킬 에스테르는 식물유 1몰에 대하여, 포화 지방산 알킬 에스테르가 1-10몰의 비율로 사용할 수 있고, 1-6몰의 비율로 사용할 수 있고, 6몰의 비율로 사용할 수 있다.

[0067] 상기 단계 1의 반응시간은 1-24시간일 수 있고, 1-18시간일 수 있고, 3-12시간일 수 있고, 12시간 일 수 있다.

[0069] 상기 단계 2의 Lipase는 sn-1,3 specific lipase로서, Lipozyme TLIM (Thermomyces lanuginosus) 또는 Lipozyme RMIM (Rhizomucor miehei)일 수 있다.

[0070] 상기 단계 2는 에스테르 교환반응이 일어나는 단계로, 상기 단계 1에 수행 후의 식물유 내 트리글리세라이드의 sn-1, sn-3 위치의 지방산이 불포화 지방산 알킬 에스테르와의 에스테르 교환 반응에 의해 sn-1 또는 sn-3에 불포화지방산을 가지는 트리글리세라이드의 함량이 늘어나게 되어, 최종적으로, sn-1 또는 sn-3에 불포화지방산을 가지고, sn-2 위치에 포화지방산을 가지는 트리글리세라이드의 함량이 증가되게 된다.

[0071] 상기 단계 2 수행 후, 식물유 전체에 대하여 sn-1 및 sn-3에 불포화지방산을 가지고, sn-2 위치에 포화지방산을 가지는 트리글리세라이드의 함량이 35%이상일 수 있다.

[0072] 이때, 상기 단계 2의 불포화 지방산 알킬 에스테르의 불포화 지방산은 올레산(oleic acid) 또는 리놀레산(linoleic acid)일 수 있다. 상기 알킬은 직쇄 또는 분지쇄의 C₁₋₁₀알킬일 수 있고, 에틸일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 올레익 에틸 에스테르(oleic ethyl ester, OEE)를 사용하였으나, 이는 일례일 뿐 이에 한정되는 것은 아니다.

[0073] 상기 단계 2의 반응시간은 0.5-5시간일 수 있고, 1-3시간일 수 있고, 3시간일 수 있다.

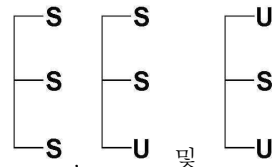
[0074] 상기 단계 2 수행 후, sn-2 위치에 포화지방산을 갖는 트리글리세라이드의 함량이 증가된 식물유는 sn-2 위치에 포화 지방산을 가지는 β -palmitin 형태의 모유대체유지로 사용할 수 있다.

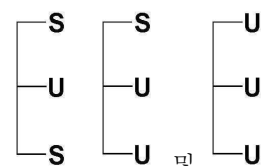
[0076] 상기 방법에 의해 종래 요오드가(IV)가 높은 유지는 포화 지방산, 구체적으로, 팔미트산의 함량이 낮아 β -palmitin 형태의 트리글리세라이드를 제조할 수 없었던 점을 개선하여, 높은 요오드가를 나타내는 유지를 출발

물질로 하여 β -palmitin 형태의 트리글리세라이드를 제조할 수 있다.

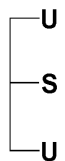
[0078] 본 발명의 다른 측면은, 상기 식물유 내 sn-2 위치에 포화지방산을 갖는 트리글리세라이드의 함량을 증가시키는 방법에 따라 제조된 sn-2 위치에 포화지방산을 갖는 트리글리세라이드의 함량이 증가된 식물유를 제공한다.

[0080] 상기 sn-2 위치에 포화지방산을 갖는 트리글리세라이드의 함량이 증가된 식물유는 sn-2 위치에 포화 지방산을 가지는 β -palmitin 형태의 모유대체유지일 수 있다.

[0081] 상기 sn-2 위치에 불포화지방산을 갖는 트리글리세라이드는, 로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 이들의 혼합일 수 있다.

[0082] 또한, 상기 식물유는, 로 이루어지는 군으로부터 선택되는 트리글리세라이드를 하나 이상 더 포함할 수 있다.

[0083] 상기 트리글리세라이드의 화학식에서, S는 포화 지방산이고, U는 불포화 지방산이다. 또한, 상기 포화 지방산은 팔미트산(palmitic acid), 미리스트산(myristic acid), 또는 스테아르산(stearic acid)일 수 있다. 상기 불포화 지방산은 올레산(oleic acid) 또는 리놀레산(linoleic acid)일 수 있다.

[0084] 상기 식물유 전체에 대하여 의 함량이 35%이상일 수 있다.

[0086] 본 발명의 다른 측면은,

[0087] sn-2 위치에 불포화지방산을 갖는 트리글리세라이드와 포화 지방산 알킬 에스테르를 Lipase존재하에 반응시키는 단계(단계 1); 및

[0088] 상기 단계 1의 반응 결과물과 불포화 지방산 알킬 에스테르를 Lipase존재하에 반응시키는 단계(단계 2)를 포함하는,

[0089] sn-2 위치에 불포화지방산을 갖는 트리글리세라이드를 sn-2 위치에 포화지방산을 갖는 트리글리세라이드로 전환시키는 방법을 제공한다.

[0091] 이하, 상기 sn-2 위치에 불포화지방산을 갖는 트리글리세라이드를 sn-2 위치에 포화지방산을 갖는 트리글리세라이드로 전환시키는 방법을 상세히 설명한다.

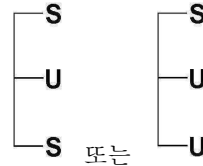
[0093] 상기 방법의 단계 1에 있어서,

[0094] sn-2 위치에 불포화지방산을 갖는 트리글리세라이드는 IV(iodine value)가 45-65일 수 있고, 50-60일 수 있고, 53일 수 있다. 또한, sn-2 위치에 불포화지방산을 갖는 트리글리세라이드는 팜유로부터 분획된 분획물일 수 있다. 이때, 상기 팜유로부터 분획된 트리글리세라이드 분획물은 IV(iodine value)가 55-75일 수 있고, 55-65일

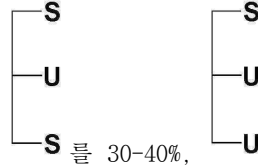
수 있고, 63일 수 있다.

[0095]

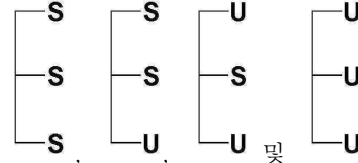
상기 단계 1의 sn-2 위치에 불포화지방산을 갖는 트리글리세라이드는



드 또는 이들의 혼합물 상태일 수 있다. S를 30-40%, U를 40-50%의 함량으로 포함할 수 있다. 또한,



상기 sn-2 위치에 불포화지방산을 갖는 트리글리세라이드물은 S, U, U 및 U로 이루어지는 군으로부터 선택되는 트리글리세라이드를 하나 이상 더 포함된 혼합물 형태일 수 있다.



[0096]

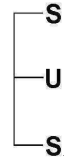
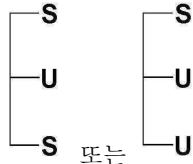
상기 트리글리세라이드의 화학식에서, S는 포화 지방산이고, U는 불포화 지방산이다. 또한, 상기 포화 지방산은 팔미트산(palmitic acid), 미리스트산(myristic acid), 또는 스테아르산(stearic acid)일 수 있다. 상기 불포화 지방산은 올레산(oleic acid) 또는 리놀레산(linoleic acid)일 수 있다.

[0098]

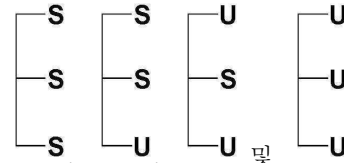
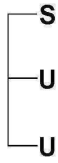
또한, 상기 방법의 단계 1의 sn-2 위치에 불포화지방산을 갖는 트리글리세라이드는 팜유로부터 분획된 분획물에 포함된 것일 수 있으므로, 단계 1에서, sn-2 위치에 불포화지방산을 갖는 트리글리세라이드를 팜유로부터 분획된 분획물로 대체하여 사용할 수 있다.

[0099]

상기 팜유로부터 분획된 분획물은



30-40%, U를 40-50%의 함량으로 포함할 수 있다. 또한, 상기 분획물은 S, U, U 및 U로 이루어지는 군으로부터 선택되는 트리글리세라이드를 하나 이상 더 포함할 수 있다.



[0100]

상기 트리글리세라이드의 화학식에서, S는 포화 지방산 에스테르이고, U는 불포화 지방산 에스테르이다. 또한, 상기 포화 지방산은 팔미트산(palmitic acid), 미리스트산(myristic acid), 또는 스테아르산(stearic acid)일 수 있다. 상기 불포화 지방산은 올레산(oleic acid) 또는 리놀레산(linoleic acid)일 수 있다.

[0102]

상기 단계 1의 Lipase는 sn-1,3 specific lipase로서, Lipozyme TLIM (Thermomyces lanuginosus)일 수 있다.

[0103]

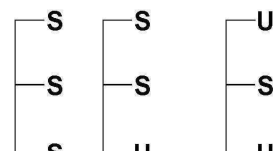
상기 단계 1은 에스테르 교환반응 및 아실 마이그레이션(acyl migration)반응이 일어나는 단계로, sn-2 위치에 불포화지방산을 갖는 트리글리세라이드의 sn-1, sn-3 위치의 지방산이 포화 지방산 알킬 에스테르의 포화지방산과 에스테르 교환반응하여, sn-1 또는 sn-3에 포화지방산을 가지는 트리글리세라이드의 함량이 늘어나고, 아실 마이그레이션으로 인해 sn-2 위치의 불포화지방산이 sn-1 또는 sn-3의 포화지방산으로 전환된다.

[0104]

상기 단계 1에서, sn-2 위치에 불포화지방산을 갖는 트리글리세라이드로서 팜유로부터 분획한 분획물을 사용하였을 경우, 상기 단계 1 수행 후, sn-2 위치에 불포화지방산을 갖는 트리글리세라이드는 분획물 전체에 대하여

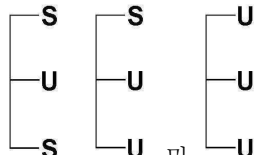
sn-2가 포화지방산인 트리글리세라이드를 40%이상 포함할 수 있다.

- [0105] 이때, 상기 단계 1의 포화 지방산 알킬 에스테르의 포화지방산은 팔미트산(palmitic acid), 미리스트산(myristic acid), 또는 스테아르산(stearic acid)일 수 있다. 상기 알킬은 직쇄 또는 분지쇄의 C₁₋₁₀알킬일 수 있고, 에틸일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 팔미틱 에틸 에스테르(palmitic ethyl ester, PEE)를 사용하였으나, 이는 일례일 뿐 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0106] 상기 단계 1에서, 포화 지방산 알킬 에스테르는 sn-2 위치에 불포화지방산을 갖는 트리글리세라이드 1몰에 대하여, 포화 지방산 알킬 에스테르가 1-10몰의 비율로 사용할 수 있고, 1-6몰의 비율로 사용할 수 있고, 6몰의 비율로 사용할 수 있다.
- [0107] 상기 단계 1의 반응시간은 1-24시간일 수 있고, 1-18시간일 수 있고, 3-12시간일 수 있고, 12시간 일 수 있다.
- [0109] 상기 단계 2의 Lipase는 sn-1,3 specific lipase로서, Lipozyme TLIM (Thermomyces lanuginosus) 또는 Lipozyme RMIM (Rhizomucor miehei)일 수 있다.
- [0110] 상기 단계 2는 에스테르 교환반응이 일어나는 단계로, 상기 단계 1에 수행 후의 1차 반응생성물 내 트리글리세라이드의 sn-1, sn-3 위치의 지방산이 불포화 지방산 알킬 에스테르와의 에스테르 교환 반응에 의해 sn-1 또는 sn-3에 불포화지방산을 가지는 트리글리세라이드의 함량이 늘어나게 되어, 최종적으로, sn-1 또는 sn-3에 불포화지방산을 가지고, sn-2 위치에 포화지방산을 가지는 트리글리세라이드의 함량이 증가되게 된다.
- [0111] 상기 단계 2 수행 후, 최종 반응생성물 전체에 대하여 sn-1 및 sn-3에 불포화지방산을 가지고, sn-2 위치에 포화지방산을 가지는 트리글리세라이드의 함량이 35%이상일 수 있다.
- [0112] 이때, 상기 단계 2의 불포화 지방산 알킬 에스테르의 불포화 지방산은 올레산(oleic acid) 또는 리놀레산(linoleic acid)일 수 있다. 상기 알킬은 직쇄 또는 분지쇄의 C₁₋₁₀알킬일 수 있고, 에틸일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 올레익 에틸 에스테르(oleic ethyl ester, OEE)를 사용하였으나, 이는 일례일 뿐 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0113] 상기 단계 2의 반응시간은 0.5-5시간일 수 있고, 1-3시간일 수 있고, 3시간일 수 있다.
- [0114] 상기 단계 2 수행 후, 생성된 sn-1 및 sn-3에 불포화지방산을 가지고, sn-2 위치에 포화지방산을 가지는 트리글리세라이드의 함량이 증가된 트리글리세라이드는 sn-2 위치에 포화 지방산을 가지는 β -palmitin 형태의 모유대체유지로 사용할 수 있다.
- [0116] 상기 sn-2 위치에 불포화지방산을 갖는 트리글리세라이드를 sn-2 위치에 포화지방산을 갖는 트리글리세라이드로 전환시키는 방법은 도 2에 나타난 바와 같은 화학반응식으로 나타낼 수 있다.
- [0118] 상기 방법에 의해 종래 요오드가(IV)가 높은 유지는 포화 지방산, 구체적으로, 팔미트산의 함량이 낮아 β -palmitin 형태의 트리글리세라이드를 제조할 수 없었던 점을 개선하여, 높은 요오드가를 나타내는 유지를 출발 물질로 하여 β -palmitin 형태의 트리글리세라이드를 제조할 수 있다.
- [0120] 본 발명의 다른 측면은, 상기 sn-2 위치에 불포화지방산을 갖는 트리글리세라이드를 sn-2 위치에 포화지방산을 갖는 트리글리세라이드로 전환에 따라 제조된 sn-2 위치에 포화지방산을 갖는 트리글리세라이드의 함량이 증가된 β -palmitin 형태의 모유대체유지를 제공한다.



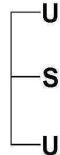
- [0122] 상기 sn-2 위치에 불포화지방산을 갖는 트리글리세라이드는, , 및 로 이루어지는 군으로부터

선택되는 어느 하나 또는 이들의 혼합일 수 있다.



또한, 상기 식물유는, , 및 로 이루어지는 군으로부터 선택되는 트리글리세라이드를 하나 이상 더 포함할 수 있다.

상기 트리글리세라이드의 화학식에서, S는 포화 지방산 에스테르이고, U는 불포화 지방산 에스테르이다. 또한, 상기 포화 지방산은 팔미트산(palmitic acid), 미리스트산(myristic acid), 또는 스테아르산(stearic acid)일 수 있다. 상기 불포화 지방산은 올레산(oleic acid) 또는 리놀레산(linoleic acid)일 수 있다.



상기 식물유 전체에 대하여 의 함량이 35%이상일 수 있다.

이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.

단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.

<제조예> 팜유 분획물의 제조

Palm oil(IV= 53)을 80℃의 향온수조에서 녹인 후 2 L beaker에 1 : 3(w/v) 비율로 Palm oil을 300 g, acetone을 900 mL 정량하고 40℃의 물로 중탕하며 충분히 교반하였다. 이것을 4℃로 유지되는 incubator에서 24시간 동안 방치하여 분별한 후 filter paper를 이용하여 고체층과 액체층을 분리하였다. 분별한 액체층을 40℃의 향온수조에서 완전히 녹인 후 감압농축을 통하여 용매를 제거함으로써 POP, POO 함량이 각각 32.84%-33.22%, 44.26%-44.3%이고, IV가 63인 Palm oil fraction(POF)를 얻었다.

<실시예 SL1-1 ~ SL1-12> 1차 반응 생성물의 제조

본 실시예 SL1-1 내지 SL1-12는 본 발명의 방법들의 단계 1에 해당한다.

250 mL 반응기에 1 : 1 - 1 : 6 mol ratio로 각각 상기 제조예에서 얻은 POF와 팔미틱 에틸 에스테르(PEE)를 정량한 후 총 기질 양의 20 wt% 비율로 Lipozyme[®] TLIM을 반응기에 넣어주었다. Shaking water bath에서 220rpm, 80℃ 조건에서 반응시간(3 hr - 12 hr)을 다르게 하여 반응을 진행하였으며, 이러한 반응 조건을 하기 표 1에 나타내었다. 반응 종료 후 0.5 μm PTFE syringe filter(Toyo Roshi Kaisha, Ltd., Japan)를 사용하여 효소를 여과하여 1차 반응생성물을 제조하였다.

표 1

실시예	기질비율	반응시간	교반속도	반응온도	Lipase
SL1-1	1:1	3	220 rpm	80 ℃	20 wt% TLIM
SL1-2	1:1	6	220 rpm	80 ℃	20 wt% TLIM
SL1-3	1:1	9	220 rpm	80 ℃	20 wt% TLIM
SL1-4	1:1	12	220 rpm	80 ℃	20 wt% TLIM
SL1-5	1:3	3	220 rpm	80 ℃	20 wt% TLIM
SL1-6	1:3	6	220 rpm	80 ℃	20 wt% TLIM

SL1-7	1:3	9	220 rpm	80 °C	20 wt% TLIM
SL1-8	1:3	12	220 rpm	80 °C	20 wt% TLIM
SL1-9	1:6	3	220 rpm	80 °C	20 wt% TLIM
SL1-10	1:6	6	220 rpm	80 °C	20 wt% TLIM
SL1-11	1:6	9	220 rpm	80 °C	20 wt% TLIM
SL1-12	1:6	12	220 rpm	80 °C	20 wt% TLIM

[0139] 상기 표 1에서, 기질 비율은 POF:PEE이다.

[0141] <실시에 SL2-1 ~ SL2-4> 2차 반응 생성물(β -palmitin형태의 트리글리세라이드(모유대체유지))의 제조

[0142] 본 실시예 SL2-1 내지 SL2-4는 본 발명의 방법들의 단계 2에 해당한다.

[0144] 2차 반응을 진행하기에 앞서 가장 결과가 좋은 1차 반응생성물(SL1-12)과 methanol을 1 : 5 (w/v)로 정량하여 충분히 교반하였다. 원심분리(2500 rpm, 5 min)를 통해 분리된 상층액(methanol)을 anhydrous sodium sulfate 로 채워진 pasteur pipet column에 통과시켜 수분과 불순물을 제거하였고, 결과물을 methanol과 1 : 1(w/v)으로 다시 한 번 정량하여 동일한 방법으로 진행하였다. 상층액에 ethyl ester와 acid 성분이 녹으면서 남은 1차 반응생성물에는 불순물이 제거되고 TAG성분만 남게 된다.

[0146] 50 mL 반응기에 기질비율을 1 : 6 mol ratio로 상기에서 정제한 1차 반응생성물(SL1-12) 0.3 g과 OEE 0.6 g을 각각 정량한 후 200rpm, 45°C 조건에서 효소종류(TLIM 또는 RMIM) 그리고 반응시간(1 hr 또는 3 hr)을 각각 다르게 하여 반응을 진행하였고, 이러한 반응 조건을 하기 표 2에 나타내었다. 효소의 양은 총 기질 양의 20 wt% 비율로 첨가하였으며, 반응 종료 후에는 0.5 μ m PTFE syringe filter를 사용하여 효소를 여과하여 β -palmitin형태의 트리글리세라이드(모유대체유지)를 표2의 조건과 같이 제조하였다.

표 2

실시예	기질비율	반응시간	교반속도	반응온도	Lipase
SL2-1	1:6	1	220 rpm	45 °C	20 wt% TLIM
SL2-2	1:6	3	220 rpm	45 °C	20 wt% TLIM
SL2-3	1:6	1	220 rpm	45 °C	20 wt% RMIM
SL2-4	1:6	3	220 rpm	45 °C	20 wt% RMIM

[0149] 상기 표 2에서, 기질 비율은 1차 반응물:OEE이다

[0151] <비교예 1> POO(dioleopalmitin)의 acyl migration 에 의한 OPO의 제조

[0152] POO-rich oil 기질을 가지고 acyl migration 반응을 이용하여 glycerol backbone의 sn-2 위치에 palmitic acid 가 위치하도록 하여 OPO의 합성을 유도하였다.

[0153] POO가 60%내외 함유한 palm oil의 liquid 분획물을 기질로 하여 acyl migration을 수행하였다. 반응은 80°C, 220 rpm으로 설정된 shaking water bath에서 12시간 동안 Lipozyme TLIM lipase를 총 기질의 20% 함유하도록 하여 진행하였다.

[0155] <비교예 2> Triolein(OOO)과 palmitic ethyl ester(PEE)의 반응을 이용한 OPO의 제조

[0156] OOO를 이용하여, PEE를 사용한 에스테르 교환반응을 수행하여 OPO(sn-2위치는 팔미트산이고, sn-1, sn-3 위치는 올레산인 TAG)을 제조하였다.

[0158] 단계 1: 000가 90%내외 함유된 고 올레인산 해바라기유(high oleic sunflower oil)과 palmitic ethyl ester를 기질로 하여 1차반응을 하였다. 이때 기질들의 몰비율은 1:0.5 ~ 1:1 (000:PEE, w/w)로 하였으며, 반응은 80℃, 220 rpm으로 설정된 shaking water bath에서 7~ 12시간 동안 Lipozyme TLIM lipase를 총 기질의 20% 함유하도록 하여 진행하였다.

[0160] 단계 2: 1차 반응물(총 10 g)에 oleic ethyl ester 가 15 g ~ 18 g 이 되도록 첨가하고, Lipozyme TLIM lipase 를 0.5 ~ 2 g 내외 추가 첨가하여 45℃, 220 rpm으로 설정된 shaking water bath에서 3~ 6시간 동안 2차 반응을 진행하였다.

[0162] <실험예 1> GC를 이용한 지방산 조성 분석 1

[0163] 지방산 함량을 확인하기 위해 지방산을 methylation시켜 지방산 메틸 에스테르(fatty acid methyl ester, FAME)의 상태로 변환시켰고 이를 gas chromatography(GC, Hewlett-Packard 6890, Avondale, PA, USA)를 이용하여 분석하였다. Methylation은 지방산의 카르복실기(-COOH)를 메틸에스테르기(-COOCH₃)로 치환하는 방법으로, 50 mL vial에 시료 100 mg을 칭량한 후 염 촉매제인 0.5 N methanolic NaOH 2 mL를 넣은 다음 30초간 교반하고 water bath에서 85℃로 10분간 반응하였다. 반응이 끝난 후 20℃의 물을 이용하여 20분간 냉각하였고 methanolic BF₃ 3 mL를 첨가하여 같은 조건으로 실험을 진행하였다. 냉각 후 FAMEs로 치환된 지방산을 추출하기 위하여 iso-octane과 포화 NaCl을 각각 3 mL와 1 mL를 첨가하여 1분간 교반하였다. 원심분리(2500 rpm, 3 min)를 통해 분리된 상층액을 anhydrous sodium sulfate로 채워진 pasteur pipet column에 통과시켜 수분과 불순물을 제거하고 GC vial에 모아 GC로 분석하였다. Column은 SPTM-2560(biscyanopropyl polysiloxane, 100 m × 0.25 mm, 0.2 μm film thickness, Supelco, Bellefonte, PA, USA)을 사용하였으며 검출기는 flame ionization detector(FID)를 사용하였다. 기기 분석 조건은 detector와 injector의 온도를 각각 285℃, 225℃로 설정하였고 oven의 온도 프로그램은 100℃에서 시작하여 4분간 유지한 후 3℃/min씩 240℃까지 올려주고 15분 동안 유지함으로써 분석을 진행하였다. 이동상 기체(carrier gas)로는 고순도 He를 사용하였고 1.0 mL/min의 유속으로 분석하였다. 시료는 1 μL를 주입하였고 split ratio는 200:1의 비율로 설정하였다. GC 분석을 통해 얻은 FAMEs에 대한 peak area 값을 이용하여 지방산 함량을 계산하였다. 각 peak의 retention time(RT) 확인은 표준물질인 Supelco 37 Component FAME Mix(Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA.)를 통하여 확인하였다.

[0165] TAG 내 sn-2 위치의 지방산 조성을 확인하기 위하여 pancreatic lipase를 이용하여 가수분해한 후 TLC를 사용해 2-monoacylglycerol(MAG)을 분리하였다. 20 mL glass test tube에 시료 10 mg, 1M Tris-HCl buffer (pH 7.6) 7 mL, 0.05% bile salt 1.75 mL, 2.2% CaCl₂ 0.7 mL, pancreatic lipase 10 mg을 넣고 1분 동안 교반한 후 37℃의 water bath에서 3분간 반응하였다. 반응이 끝나고 30초간 교반한 후 동일한 조건에서 3분간 반응하였고 다시 30초간 교반한 후 동일한 조건에서 2분간 반응하고 30초 동안 교반하였다. 교반이 끝난 후 diethyl ether(DE) 4 mL를 test tube에 넣고 1분간 교반하여 원심분리(2500 rpm, 5 min)를 하였다. 이후에 상층액(DE)을 anhydrous sodium sulfate로 채워진 pasteur pipet column에 통과시켜 수분과 불순물을 제거한 뒤 N₂ gas를 사용하여 DE를 제거하였다. DE가 제거된 glass test tube에 DE 150 μL를 다시 넣은 후 30초 동안 교반하여 TLC silica gel 60 F₂₅₄(MERCK CO., Darmstadt, Germany)에 spotting한 후 혼합용매(hexane : diethyl ether : acetic acid = 50 : 50 : 1, v/v/v)로 채워진 TLC tank에서 전개하였다. 전개가 끝난 TLC plate에 드라이로 열을 주어 용매를 날린 후 5% 2,7-dichlorofluorescein in EtOH으로 염색하여 UV-spectrophotometer를 통해 확인한 2-MAG band를 분리하였다. 분리한 2-MAG의 methylation은 첨가량을 0.5 N methanolic NaOH 1.5 mL, methanolic BF₃ 2 mL, iso-octane 2 mL으로 변경한 것을 제외한 모든 과정을 상기와 동일하게 진행하였다.

[0167] 상기 실험예 1 수행에 따른 미정제 팜유, 팜유 분획물 및 PEE의 지방산 조성을 하기 표 3에 나타내었으며, 팜유 분획물에 대하여 총 지방산, sn-2 위치의 지방산 %를 평가하여 표 4에 나타내었다.

표 3

	지방산 조성		
	1차 반응 기질		
지방산	Palm oil	Palm oil fraction(4℃)	Palmitic ethyl ester
C12:0	0.98±0.02	1.22±0.01	ND
C14:0	1.62±0.02	1.66±0.01	0.72±0.02
C16:0	44.94±0.17	38.15±0.00	99.28±0.02
C18:0	4.75±0.04	4.10±0.08	ND
C18:1(n-9)	36.85±0.12	41.54±0.10	ND
C18:1(n-7)	0.91±0.03	1.01±0.01	ND
C18:2(n-6)	9.94±0.03	12.31±0.00	ND

[0169] The results are expressed as the mean ± SD(n=2)

[0170] ND : Not detected

[0171] Unit: area%

표 4

	지방산 조성	
	Palm oil fraction(4℃)	
지방산	총 지방산	sn-2 위치
C12:0	1.22±0.01	1.29±0.04
C14:0	1.66±0.01	0.56±0.10
C16:0	38.15±0.00	9.24±0.54
C18:0	4.10±0.08	0.93±0.20
C18:1(n-9)	41.54±0.10	64.38±0.78
C18:1(n-7)	1.01±0.01	0.99±0.05
C18:2(n-6)	12.31±0.00	22.62±0.06

[0172] The results are expressed as the mean ± SD(n=2)

[0173] ND : Not detected

[0174] Unit: area%

[0175] 상기 표 3 및 4에 나타난 바와 같이, 기질의 주요 지방산은 palmitic acid(38.15 area%)와 oleic acid(41.54 area%)를 나타내었다. sn-2에는 대부분 oleic acid(64.38 area%)로 구성되었다.

[0176] 상기 실험에 1 수행에 따른 1차 반응 생성물에 대한 총 지방산 및 sn-2 위치의 지방산 %를 평가하여 표 5에 나타내었다.

표 5

	지방산 조성	
	1차 반응 생성물	
지방산	총 지방산	sn-2 위치
C12:0	0.37±0.06	ND
C14:0	0.86±0.02	ND
C16:0	73.47±0.00	61.57±1.86
C18:0	2.03±0.02	ND

[0180]

C18:1(n-9)	17.95±0.05	29.43±2.05
C18:1(n-7)	0.46±0.04	ND
C18:2(n-6)	4.88±0.04	9.00±0.19

[0183] The results are expressed as the mean ± SD(n=2)

[0184] ND : Not detected

[0185] Unit: area%

[0187] 1차 반응 생성물의 주요 지방산은 palmitic acid(73.47 area%)와 oleic acid(17.95 area%)를 나타내었다. *sn*-2에는 대부분 palmitic acid(61.57 area%)와 oleic acid(29.43 area%)로 구성되었다. 특히 기질의 지방산 조성 과 비교했을 때, palmitic acid 함량이 38.15 area%에서 73.47 area%로 증가하였으며, oleic acid 함량이 41.54 area%에서 17.95 area%로 감소하였다. 이는 palmitic ethyl ester와 반응하여 *sn*-1,3 위치에 특이적으로 작용하는 효소에 의해 *sn*-1,3 위치에 결합되어 있던 oleic acid의 상당량이 palmitic acid로 치환되었기 때문이다. 또한 acyl migration이 일어나 *sn*-1,3위치의 palmitic acid가 *sn*-2 위치로 이동하여 9.24 area%에서 61.57 area%로 양이 증가하였다.

[0189] 상기 실험예 1 수행에 따른 2차 반응 생성물(β -palmitin(모유대체유지))에 대한 총 지방산 및 *sn*-2 위치의 지방산 %를 평가하여 표 6에 나타내었다.

표 6

[0190]

총 지방산 조성	SL2-2	SL2-4
C10:0	0.56±0.01	0.57±0.01
C12:0	2.14±0.02	2.26±0.06
C14:0	0.38±0.08	0.33±0.00
C16:0	30.82±0.11	30.29±0.24
C18:0	2.25±0.00	2.30±0.04
C18:1(trans)	0.68±0.01	0.75±0.02
C18:1(n-9)	53.37±0.16	53.52±0.11
C18:1(n-7)	0.63±0.01	0.61±0.03
C10:2(n-6)	9.20±0.02	9.37±0.01
<i>sn</i> -2 지방산		
C16:0	76.05±1.36	70.77±0.23
C18:0	ND	ND
C18:1(n-9)	23.95±1.36	29.23±0.23
C18:2(n-6)	ND	ND

[0191] The results are expressed as the mean ± SD(n=2)

[0192] ND : Not detected

[0193] Unit: area%

[0195] 상기 표 6에 나타난 바와 같이,

[0196] β -palmitin(모유대체유지)의 지방산 조성 중 함량이 가장 높은 지방산은 oleic acid(53.37 - 53.52 area%)와 palmitic acid(30.29 - 30.82 area%)이었다. 모유 지방의 palmitic acid 함량은 15.43 - 24.26 wt%로 알려져 있다. 특히 1차 반응 생성물의 지방산 조성 과 비교했을 때, oleic acid 함량이 17.95 area%에서 53.37 - 53.52 area%로 증가하였으며, palmitic acid 함량이 73.47 area%에서 30.29 - 30.82 area%로 감소하였다. 이는 *sn*-1,3 위치에 특이적으로 작용하는 효소에 의해 *sn*-1,3 위치에 결합되어 있던 palmitic acid의 상당량이 oleic

acid로 치환되었기 때문이다.

[0198] 상기 결과에 의해 β -palmitin(모유대체유지)의 sn-2위치의 palmitic acid 함량은 70.77 - 76.05 area%로 나타났다. 가장 높은 sn-2위치의 palmitic acid 함량은 SL2-2(76.05 area%)에서 나타났고, 가장 낮은 값은 SL2-4(70.77 area%)에서 나타났다.

[0199] 모유 지방의 sn-2위치의 palmitic acid 함량은 50.6 - 58.0%로 알려져 있으며, 본 발명에 따른 방법에 의해 제조된 β -palmitin(모유대체유지)는 이를 벗어나는 초과하는 범위를 가짐을 알 수 있다.

[0200] 따라서, 본 발명에 따른 방법은 sn-2 위치에 포화 지방산을 가지는 β -palmitin 형태의 모유대체유지의 제조에 유용하게 사용될 수 있다.

[0202] <실험예 2> Ag-HPLC를 이용한 TAG 분석

[0203] TAG 이성질체(대칭형 구조 및 비대칭형 구조)를 분리하기 위해 Ag-HPLC(Younglin, Anyang, Korea)를 이용하여 분석하였다. Column은 Silver ion column (Chromspher 5 lipids 250 mm $\times$ 4.6 mm i.d., Varian, Netherlands)을 사용하였으며 검출기는 Sedex 75 evaporative light scattering detector(ELSD, Dedere, Alfortville, France)를 사용하였다. ELSD의 온도 및 압력 조건은 40°C, 2.2 bar로 설정하였고, N₂ 가스를 사용하였다. Flow rate는 1.5 mL/min으로 설정하였으며 이동상 용매는 기울기 용리 조건으로 용매 A(hexane : iso-propanol : acetonitrile = 100:0.1:0.1, v/v/v)와 용매 B(hexane : iso-propanol : acetonitrile = 100:1:1, v/v/v)를 사용하였고 시료들은 1 μ L/1 mL 농도로 혼합용매(chloroform : hexane = 1 : 4, v/v)에 녹여서 20 μ L를 주입하여 분석하였다. 분석시료가 주입될 때에는 용매 A와 B를 100:0의 비율로 설정하고 5분간 흘려주다가 50분까지 80:20의 비율로 변화시켰다. 이후에 60분까지 50:50의 비율로 변화시키고 1분 동안 유지하였으며 62분까지 100:0의 비율로 변화시킨 후 70분까지 유지함으로써 분석을 완료하였다. 각 peak의 retention time(RT) 확인은 OPO standard(Samyang, Seoul, Korea)를 통하여 확인하였다.

[0205] Ag-HPLC로 분석된 기질의 TAG(트리글리세라이드)의 조성을 하기 표 7에 나타내었으며, 크로마토그램을 도 3에 나타내었다.

표 7

TAG 종류	Palm oil	Palm oil fraction(4°C)
SSS	6.81 $\pm$ 0.36	ND
SUS	48.84 $\pm$ 0.27	40.78 $\pm$ 0.09
SSU	4.31 $\pm$ 0.11	2.57 $\pm$ 0.16
SUU	37.79 $\pm$ 0.24	54.03 $\pm$ 0.08
USU	0.20 $\pm$ 0.01	ND
UUU	2.04 $\pm$ 0.03	2.63 $\pm$ 0.15

[0208] The results are expressed as the mean $\pm$ SD(n=2)

[0209] ND : Not detected

[0210] SSS: sn-1, sn-2, sn-3위치 모두 포화지방산인 TAG

[0211] SUS: sn-1, sn-3위치는 포화지방산이고, sn-2 위치는 불포화지방산인 TAG

[0212] SSU: sn-1, sn-2위치는 포화지방산이고, sn-3 위치는 불포화지방산인 TAG

[0213] SUU: sn-1위치는 포화지방산이고, sn-2, sn-3 위치는 불포화지방산인 TAG

[0214] USU: sn-2위치는 포화지방산이고, sn-1, sn-3 위치는 불포화지방산인 TAG

[0215] UUU: sn-1, sn-2, sn-3위치 모두 불포화지방산인 TAG

[0216] Unit: area%

[0218] 도 3은 Ag-HPLC로 분석된 기질의 크로마토그램을 나타낸 것이다(S=포화 지방산, U=불포화 지방산). A) Palm oil, B) Palm oil fraction(실시에 1의 단계 1에서 분획한 팜유 분획물), C) Palmitic ethyl ester, D) Oleic ethyl ester

[0220] 표 7 및 도 3에 나타난 바와 같이, 팜유 분획물은 SUS 및 SUU의 함량이 90% 이상임을 알 수 있다.

[0222] Ag-HPLC로 분석된 실시예 SL1-1 내지 SL1-12의 반응 생성물의 TAG(트리글리세라이드)의 조성을 하기 표 8에 나타내었으며, 크로마토그램을 도 4에 나타내었다.

표 8

실시예	SSS	SUS	SSU	SUU	USU	UUU
SL1-1	3.70	42.18	5.28	42.96	1.12	4.78
SL1-2	9.19	33.99	12.72	39.08	1.67	3.36
SL1-3	14.13	26.74	20.36	32.52	2.66	3.58
SL1-4	16.79	23.40	24.48	28.57	3.29	3.47
SL1-5	6.79	44.77	5.78	40.59	ND	2.07
SL1-6	19.43	34.37	14.65	29.39	ND	2.17
SL1-7	32.16	24.10	21.09	19.97	1.34	1.33
SL1-8	40.76	18.13	26.43	12.85	1.02	0.81
SL1-9	8.76	60.16	5.33	25.75	ND	ND
SL1-10	32.90	43.09	9.64	14.36	ND	ND
SL1-11	53.89	24.44	13.62	8.04	ND	ND
SL1-12	67.29	13.89	14.90	3.92	ND	ND

[0224] ND : Not detected

[0225] SSS: sn-1, sn-2, sn-3위치 모두 포화지방산인 TAG

[0226] SUS: sn-1, sn-3위치는 포화지방산이고, sn-2 위치는 불포화지방산인 TAG

[0227] SSU: sn-1, sn-2위치는 포화지방산이고, sn-3 위치는 불포화지방산인 TAG

[0228] SUU: sn-1위치는 포화지방산이고, sn-2, sn-3 위치는 불포화지방산인 TAG

[0229] USU: sn-2위치는 포화지방산이고, sn-1, sn-3 위치는 불포화지방산인 TAG

[0230] UUU: sn-1, sn-2, sn-3위치 모두 불포화지방산인 TAG

[0231] Unit: area%

[0233] 도 4는 실시예 SL1-1 내지 SL1-12의 반응 생성물에 대한 Ag-HPLC로 분석된 기질의 크로마토그램을 나타낸 것이다.

[0235] 표 8 및 도 4에 나타난 바와 같이,

[0236] 반응 시간이 길어질수록 acyl migration이 일어나 sn-2 위치에 존재하는 포화지방산의 함량이 늘어난다. SL1-12(TLIM, 1:6, 12 hr, 80℃)은 sn-2 위치에 포화지방산을 포함하는 SSS, SSU 함량이 가장 높은 1차 생성물로써 함이 82.19 area%이었다. SL1-12를 기질로 사용하여 2차 반응인 β -palmitin(모유지방 대체지)합성을 진행하였

다.

[0238] Ag-HPLC로 분석된 실시예 SL2-1 내지 SL2-4의 반응 생성물의 TAG(트리글리세라이드)의 조성을 하기 표 9에 나타내었으며, 크로마토그램을 도 5에 나타내었다.

표 9

[0240]

TAG 종류	SL2-1	SL2-2	SL2-3	SL2-4
SSS	24	9.5	10.6	3.6
SUS	6.7	ND	ND	ND
SSU	48.8	51	51.4	49.6
SUU	9.6	11.2	10.1	10.6
USU	10.9	28.3	27.8	36.2
UUU	ND	ND	ND	ND

[0241] ND : Not detected

[0242] SSS: sn-1, sn-2, sn-3위치 모두 포화지방산인 TAG

[0243] SUS: sn-1, sn-3위치는 포화지방산이고, sn-2 위치는 불포화지방산인 TAG

[0244] SSU: sn-1, sn-2위치는 포화지방산이고, sn-3 위치는 불포화지방산인 TAG

[0245] SUU: sn-1위치는 포화지방산이고, sn-2, sn-3 위치는 불포화지방산인 TAG

[0246] USU: sn-2위치는 포화지방산이고, sn-1, sn-3 위치는 불포화지방산인 TAG

[0247] UUU: sn-1, sn-2, sn-3위치 모두 불포화지방산인 TAG

[0248] Unit: area%

[0250] 도 5는 실시예 SL2-1 내지 SL2-4의 반응 생성물에 대한 Ag-HPLC로 분석된 기질의 크로마토그램을 나타낸 것이다.

[0252] 상기 표 9 및 도 5에 나타난 바와 같이,

[0253] β -palmitin의 주요 성분 중 하나인 OPO(sn-2위치는 팔미트산이고, sn-1, sn-3 위치는 올레산인 TAG)는 USU의 TAG 형태를 나타낸다. USU의 형태는 10.9%(SL2-1)에서 36.2%(SL2-4)의 범위로 나타났다. SSU 형태(PPO)의 TAG 또한 sn-2 위치에 palmitic acid가 존재하는 β -palmitin이기 때문에 USU와 함께 영양학적으로 가치가 있다고 할 수 있다.

[0255] 효소의 종류 및 반응시간 측면에서, TLIM 및 RMIM를 촉매로 사용하였을 경우 둘 다 반응 시간을 짧은 반응 시간(1 hr) 보다 3 hr로 하였을 때 USU의 합성이 많이 일어났으나 RMIM을 사용했을 때에 더 많은 양의 USU 합성이 일어났다.

[0257] 아울러, 각 효소에서 USU 및 SSU의 합성량이 우수한 SL2-2(TLIM, 3 hr, 45°C), SL2-4(RMIM, 3 hr, 45°C)의 TAG 조성을 비교해봤을 때, sn-2 위치에 포화지방산을 포함하는 SSU와 USU의 합은 SL2-2와 SL2-4가 각각 79.3 area% 그리고 85.8 area%이었으며, 두 조건 모두 75% 이상의 높은 함량을 나타냄을 알 수 있다.

[0259] Ag-HPLC로 분석된 비교예 1에서 P00의 함량이 높은 유지의 12시간 acyl migration 반응후의 Ag-HPLC 분석결과

를 하기 표 10에 나타내었다.

표 10

[0260]

TAG 종류	P00-rich oil acyl migration
SSS	6.5
SUS	5.4
SSU	19.6
SUU	37.0
USU	12.0
UUU	19.6

[0261]

SSS: sn-1, sn-2, sn-3위치 모두 포화지방산인 TAG

[0262]

SUS: sn-1, sn-3위치는 포화지방산이고, sn-2 위치는 불포화지방산인 TAG

[0263]

SSU: sn-1, sn-2위치는 포화지방산이고, sn-3 위치는 불포화지방산인 TAG

[0264]

SUU: sn-1위치는 포화지방산이고, sn-2, sn-3 위치는 불포화지방산인 TAG

[0265]

USU: sn-2위치는 포화지방산이고, sn-1, sn-3 위치는 불포화지방산인 TAG

[0266]

UUU: sn-1, sn-2, sn-3위치 모두 불포화지방산인 TAG

[0267]

Unit: area%

[0269]

상기 표 10에 나타난 바와 같이,

[0270]

비교예 1과 같이, P00의 함량이 높은 유지를 사용하여 acyl migration만을 수행할 경우에, 목적하는 sn-2위치에 포화지방산을 가지는 트리글리세라이드의 함량이 매우 낮음을 알 수 있다.

[0272]

Ag-HPLC로 분석된 비교예 2에서 기질비율별(000:PEE=1:0.75 ~ 1:1 몰) 1차 반응(단계 1)과 2차 반응(단계 2) 후, Ag-HPLC 분석결과를 하기 표 11에 나타내었다.

표 11

[0273]

TAG 종류	1차반응결과		2차반응결과	
	000:PEE =1:0.75 몰	000:PEE =1:1 몰	000:PEE =1:0.75 몰	000:PEE =1:1 몰
SSS	1	2	0	0
SUS	3	4	1	1
SSU	7	12	3	5
SUU	32	35	14	17
USU	10	12	14	18
UUU	48	35	67	58

[0274]

SSS: sn-1, sn-2, sn-3위치 모두 포화지방산인 TAG

[0275]

SUS: sn-1, sn-3위치는 포화지방산이고, sn-2 위치는 불포화지방산인 TAG

[0276]

SSU: sn-1, sn-2위치는 포화지방산이고, sn-3 위치는 불포화지방산인 TAG

[0277]

SUU: sn-1위치는 포화지방산이고, sn-2, sn-3 위치는 불포화지방산인 TAG

[0278]

USU: sn-2위치는 포화지방산이고, sn-1, sn-3 위치는 불포화지방산인 TAG

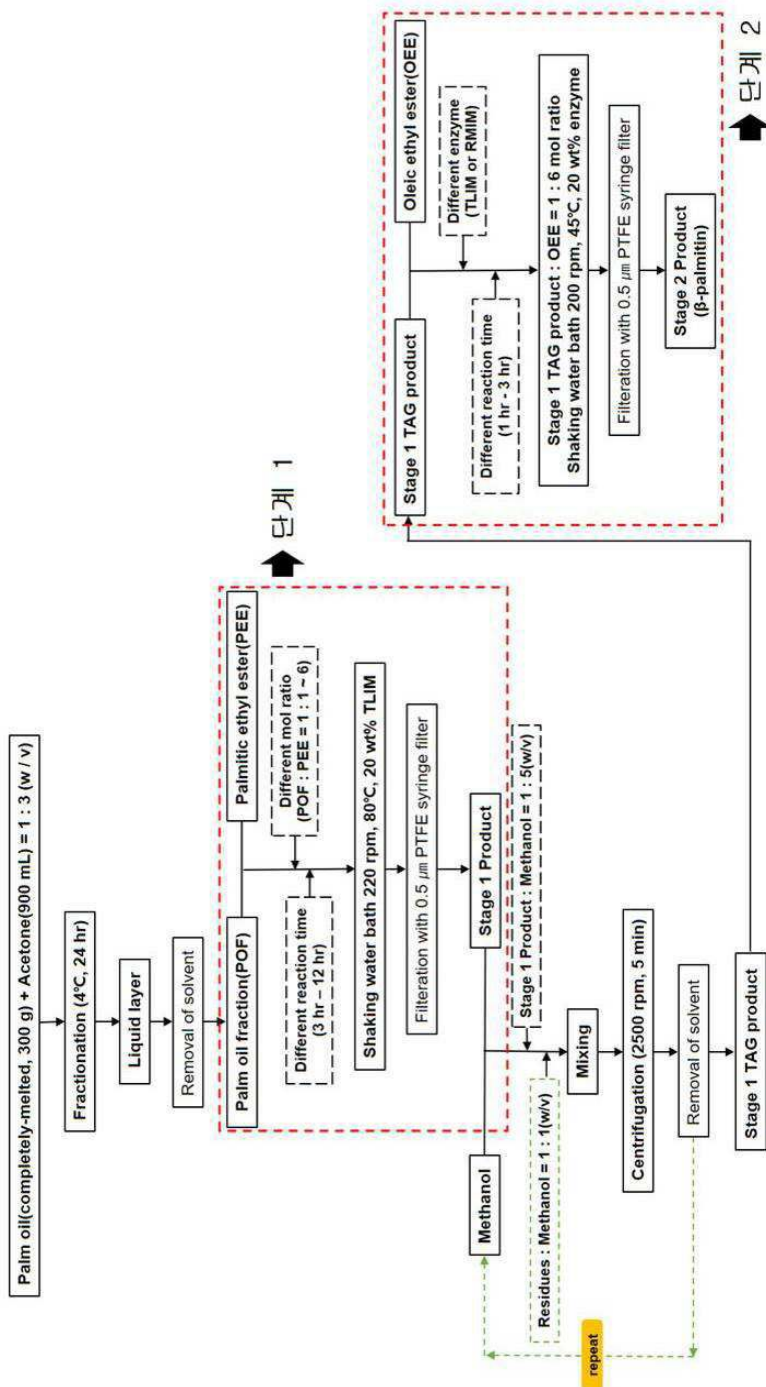
[0279]

UUU: sn-1, sn-2, sn-3위치 모두 불포화지방산인 TAG

- [0280] Unit: area%
- [0282] 상기 표 11에 나타난 바와 같이,
- [0283] sn-1, sn-2, sn-3위치 모두 올레산을 가지는 트리글리세라이드를 출발물질로 할 경우, 1차 반응 후, SSS, SSU, USU의 함량 합이 본 발명에 따른 방법과 비교하여 현저하게 낮고, 2차 반응 후, 최종적으로 생성되는 물질에서도, USU 및 SSU의 함량이 본원 발명과 비교하여, 1/3이하의 낮은 함량을 나타내는 것을 알 수 있다.
- [0285] 상기와 같이, 본 발명에 따른 방법으로 제조된 β -palmitin(모유대체유지)는 OPO와 같은 USU 및 PPO와 같은 SSU의 함량이 65% 이상이며, SL2-4의 경우 80% 이상인 바, 매우 높은 함량을 나타냄을 알 수 있다. 또한, 출발물질이 본원 발명과 같이 요오드가 높은 식물유 또는 팜유 분획물일 경우에서도 요오드가 낮은 출발물질을 이용하는 기존의 제조방법과 대등한 β -palmitin(모유대체유지)의 생성율을 나타낸다.
- [0287] 따라서, 본 발명에 따른 방법으로 제조된 β -palmitin(모유대체유지)는 모유를 대체하는 유지로 유용하게 사용될 수 있고, 본 발명에 따른 방법은 모유대체유지의 제조에 유용하게 사용될 수 있다.

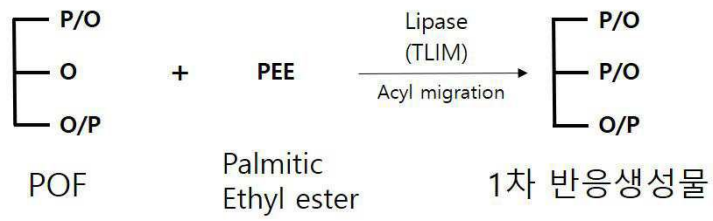
도면

도면1

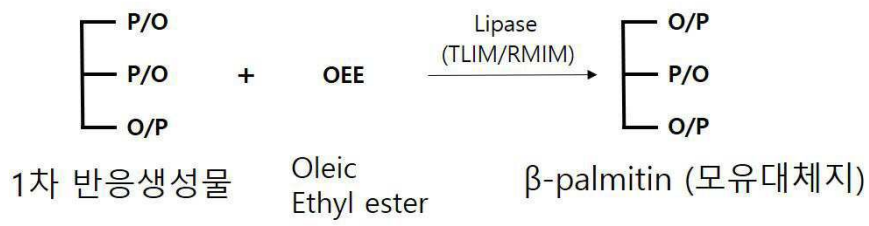


도면2

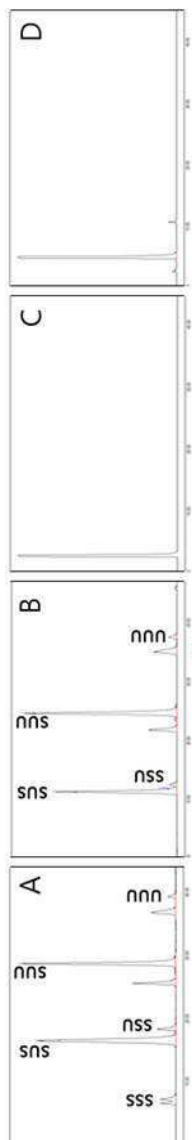
STAGE 1



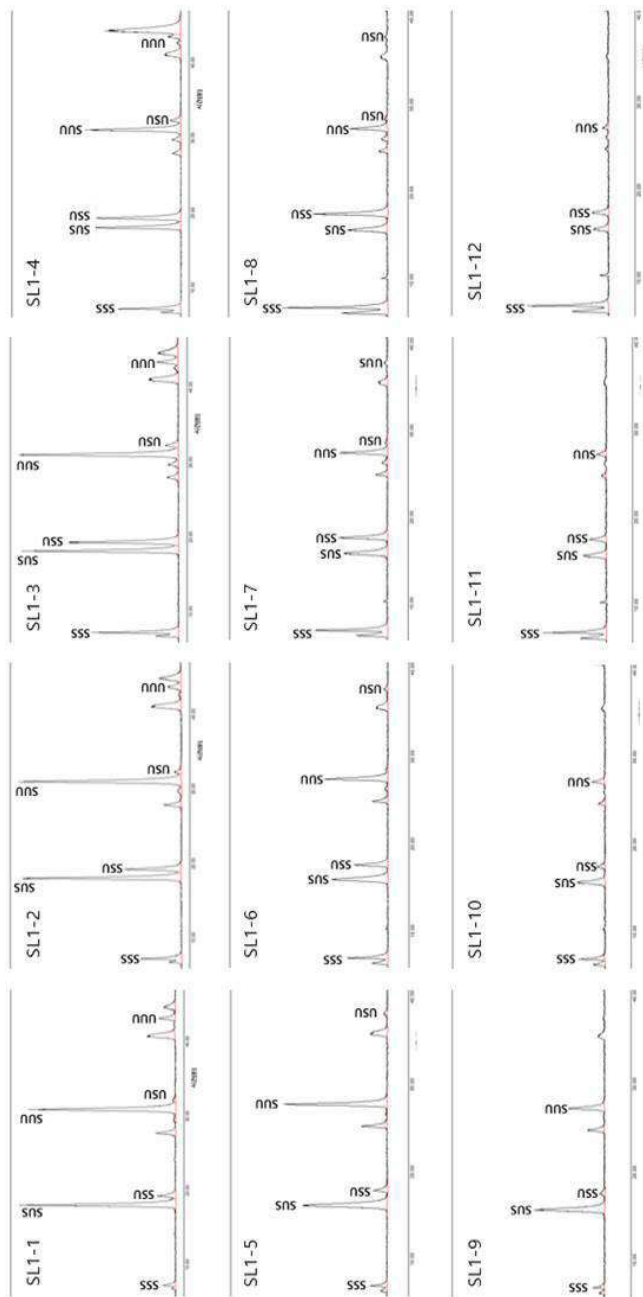
STAGE 2



도면3



도면4



도면5

