

고정화 리파제를 이용한 충전형 효소생물반응기 내에서의 무-트랜스 유지 연속 생산을 위한 에스테르 교환 반응의 최적화

김상우 · 박경민 · 하재욱¹ · 이재환 · 장판식*

서울산업대학교 식품공학과, ¹식품의약품안전청 건강기능식품국 영양기능식품정책과

Optimization of Interesterification Reaction for the Continuous Production of *trans*-Free Fat in a Packed Bed Enzyme Bioreactor with Immobilized Lipase

Sang Woo Kim, Kyung Min Park, Jae Uk Ha¹, JaeHwan Lee, and Pahn-Shick Chang*

Department of Food Science and Technology, Seoul National University of Technology

¹Nutrition and Functional Food Policy Division, Korea Food and Drug Administration

Abstract Epidemiological studies showed that high *trans*-fat consumption is closely associated with getting the risks of cardiovascular disease. The objective of this study was to produce *trans*-free fat through lipase-catalyzed interesterification, as a substitute for the cream margarine commonly used in industry. Optimum conditions for interesterification in a packed bed enzyme bioreactor (PBEB) were determined using response surface methodology (RSM) based on central composite design. Three kinds of reaction variables were chosen, such as substrate flow rate (0.4-1.2 mL/min), reaction temperature (60-70°C), and ratio of fully hydrogenated canola oil (FHCO, 35-45%) to evaluate their effects on the degree of interesterification. Optimum conditions from the standpoint of solid fat content (SFC) were found to be as follows: 0.4 mL/min flow rate, 64.7°C reaction temperature, and 42.8% (w/w) ratio of FHCO, respectively. The half-life of immobilized lipase in PBEB with two stages at 60°C (1st stage) and 55°C (2nd stage) was about more than 30 days as estimated by extrapolating the incubation time course of tristearoyl glycerol (TS) conversion, whereas the half-life of the enzyme in PBEB with single stage at 65°C was only about 15 days. Finally, the results from SFC analysis suggest that *trans*-free fat produced in this study seems to be a suitable substitute for the cream margarine commonly used in industry.

Key words : interesterification, *trans*-free fat, packed bed enzyme bioreactor, solid fat content, response surface methodology

서 론

서구식으로 변화하고 있는 현대인의 식습관으로 인해 그 섭취가 급격히 증가하고 있는 트랜스 유지는 LDL 콜레스테롤 함량을 높이는 반면에 HDL 콜레스테롤 함량을 낮추는 이중적인 위해작용을 일으키며, 이로 인하여 심혈관 계통에 좋지 않은 영향을 준다는 결과가 보고되면서 많은 주목을 받고 있다(1,2). 이 외에도 각종 세포기능이나 면역력을 저하시키는 등 트랜스 유지의 유해성에 대한 학계의 연구보고가 잇따르고 있다(3).

트랜스 유지를 생성시키는 과정 중 식품산업에서 문제가 되는 것은 유지를 경화(hydrogenation)시키는 공정과정, 즉 수소첨가의 과정에서 트랜스 유지가 생성된다는 것이며 특히 부분적으로 경화된 유지에 많은 양이 포함되어 있는 것으로 알려져 있다(4). 따라서 트랜스 유지의 함량을 낮출 수 있도록 유지의 경화공정을 배제하는 방법을 사용함으로써 다양한 형태의 물성을 갖는 무-

트랜스 유지를 제조하려는 시도가 여러 가지 형태로 수행되고 있다(5-6). 그 중 에스테르 교환반응은 sodium methoxide 등과 같은 무기촉매나 리파제(lipase) 효소와 같은 생체촉매를 이용하여 중성지방을 구성하고 있는 지방산의 위치나 분포를 재배열시키되 기존의 유지와 유사한 물성을 갖는 새로운 구성의 재조합유지를 제조하는 방법이다. 즉, 에스테르 교환반응을 통하여 원료유지의 융점이나 고체지방지수(solid fat content, SFC) 등의 이화학적 특성을 변형시켜 기존의 유지와 유사하게 제조할 수 있으며 그 결과, 트랜스 지방산을 전혀 포함하지 않으면서 동시에 기존의 사용유지와 물성이 유사한 무-트랜스 유지를 대체 생산할 수 있게 되었다(7). 특히 효소적 에스테르 교환반응은 중성지방의 지방산에 대해 기질특이성이 있는 생체촉매인 lipase를 활용함으로써 무기촉매를 사용하는 방법에 비해 동질성이 높은 고순도의 유지를 제조할 수 있으며, 또한, 무기촉매를 이용하는 반응에 비해 상대적으로 낮은 온도 및 압력인 상온·상압 하에서의 반응이 가능하므로 가열 및 가압처리 비용에 대한 경제적 부담이 없고, 무기촉매반응의 결과 발생하는 촉매제거 및 부산물 생성 등의 어려움이 없는 연속식 공정이 가능하다. 이러한 연속식 효소반응은 원료유지의 조성비, 반응온도, 기질의 흐름속도 등 여러 가지 반응조건에 따라 반응곡선의 양상이 달라지므로 이러한 변수들을 최적화할 필요가 있다. 따라서, 본 논문에서는 산업체가 요구하는 무-트랜스 유지를 제조하기 위한 연속식 효소적 에스테르 교환반응의 공정 단계를 설계하여 최적의 연속식 반응 조건을 반

*Corresponding author: Pahn-Shick Chang, Department of Food Science and Technology, Seoul National University of Technology, Seoul 139-743, Korea
Tel: 82-2-970-6437
Fax: 82-2-970-6460
E-mail: pschang@snut.ac.kr
Received January 14, 2009; revised February 25, 2009; accepted March 5, 2009

응표면분석법(response surface methodology, RSM)에 의하여 확립하고자 하였으며, 최적의 연속식 반응조건 하에서 제조되는 유지의 생산 안정성 분석을 통해 산업체 현장으로의 적용 가능성을 타진하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 기기

효소적 에스테르 교환반응을 수행하기 위하여 카놀라유를 완전히 경화시킨 극도경화유(fully hydrogenated canola oil, FHCO)를 원료유지로 사용하였는데 이는 (주)롯데삼강(Lottesamkang Co., Seoul, Korea)으로부터 기증 받았으며, 또 다른 원료유지인 대두유(soybean oil, SO)는 (주)CJ(CJ Corp., Seoul, Korea)의 시판 식용유를 구입하여 사용하였다. 효소는 Lipozyme TLIM(Novozymes, Bagsvaerd, Denmark)을 선정하여 하였으며, 반응온도를 일정하게 유지하기 위해서는 전기오븐(Sanyo, Osaka, Japan)과 항온순환수조(Jeio Tech, Seoul, Korea)를 사용하였다. 효소생물반응기 내부로 기질로서 연속적으로 투입하는 원료유지의 유속을 일정하게 유지하기 위하여 튜브 연동식 펌프(Eyela, Tokyo, Japan)를 이용하였으며, HPLC-ELSD에 의한 중성지방 분석을 위해 유기용매는 HPLC용 특급시약(JT Baker, Phillipsburg, NJ, USA)을 구입하여 사용하였다.

연속식 효소적 에스테르 교환 반응

연속식 효소적 에스테르 교환 반응의 최적화를 효율적으로 수행하기 위하여 회분식 효소적 에스테르 교환 반응의 최적조건을 기초로 하되 원료유지의 조성 및 반응온도, 반응시간, 효소 첨가량 등의 중요 변수를 분석선정하여 연속식 공정에 적용하였는데 (8), 먼저 원료유지는 FHCO와 SO의 혼합비를 45:55(w/w), 반응온도는 70°C로 각각 조정하였다(9). 또한 회분식 반응에서 평형 도달 시간(6 hr) 및 효소첨가량에 대한 원료유지 투입량 비율(0.1, w/w)을 고려하여 연속식에서는 효소사용량을 1,640 units (interesterification unit, 9.37 g)으로 하되, 기질인 원료유지 유입 및 방출의 흐름속도는 0.4 mL/min으로 조정함으로써 충전형 효소생물반응기(packed bed enzyme bioreactor, PBEB, bed volume: 20 mL)내에서의 원료유지 머무름시간(효소와의 접촉시간)을 50 min이 되도록 하여 연속식 반응을 시작하였다. 이상의 조건을 기본으로 하여 PBEB(Fig. 1) 내에서 고정화된 lipase에 의한 무-트랜스 유지를 연속적으로 생산하되, 이를 위한 최종의 완성된 최적 조건을 확립하기 위하

여 기본조건을 여러 가지로 변형시켜 시도하였다.

연속식 효소적 에스테르 교환반응의 최적화를 위한 실험설계

중심합성계획(Central composite design)에 따라 연속식 효소적 에스테르 교환반응을 수행하였으며, 반응표면분석법(RSM)을 가동하기 위하여 minitab program을 사용하여 통계처리분석을 수행하였다(10). 연속식 효소적 에스테르 교환반응에서 요인 변수는 원료유지 중 FHCO의 함량(35-45%, X_1), 반응온도(60-70°C, X_2) 및 유속(0.4-1.2 mL/min, X_3) 등 이었으며, HPLC-ELSD 분석에 의한 TS 전환율을 반응변수(Y)로 하여 RSM을 설계하였다(Table 1).

반응 생성물의 중성지방 분석

효소적 에스테르 교환반응 생성물 내의 중성지방(triacyl glycerol, TG) 정량분석을 위하여 먼저, PBEB를 통하여 제조된 유출 시료 20 mg을 methylene chloride 용액(hexadecane(internal standard)이 0.01%(w/v)로 용해되어 있음) 10 mL에 용해시킨 후 0.45 μ m membrane filter로 여과함으로써 전처리를 거친 시료로 준비하였다.

본 분석을 위하여 HPLC-ELSD를 이용하였는데 HPLC는 Jasco LC 2002(Tokyo, Japan), ELSD는 Softa Corporation 400S(Westminster, CO, USA)로 각각 구성되었다. 반응생성물 분석을 위한 이동상은 acetonitrile과 methylene chloride의 혼합용매를 1.0 mL/min의 속도로 흘려주되, acetonitrile과 methylene chloride가 7:3(v/v)인 혼합비율에서 시작하여 60 min 동안 3:7(v/v)의 비율로 직선적으로 변화하도록 조정하였으며 이 후 10 min 동안은 동일한 조성으로 유지하였다. 그 이 후 10 min 동안 직선적으로 변화하되 최종의 비율이 7:3(v/v)이 되도록 조정하였으며 이 비율의 조건 하에서 20 min 동안 이동상을 통과시킨 후 분석을 종료하였다. Column은 Nomura Chemical Corporation(Aichi, Japan)의 Develosil C30 DG 5(250 mm, 4.6 mm, 5 μ m)를 사용하였다.

PBEB를 관통하여 연속적으로 제조되는 반응생성물의 에스테르 교환반응 정도를 정량화하기 위하여 원료유지내의 TG 변화를 앞서 설명한 HPLC-ELSD 방법에 의해 경시적으로 분석하였다. 특히, 효소적 에스테르 교환반응의 정도는 원료유지내의 TG 들 중 HFCO내의 주 성분인 tristearoyl glycerol(TS)의 변화를 추적하여 TS의 전환율(relative conversion of TS, %)로 나타내었으며 그 계산식은 다음과 같다(11-12).

Relative conversion of TS(%) =

$$\frac{\text{TS content at initial time} - \text{TS content at reaction time}}{\text{TS content at initial time}} \times 100$$

반응 생성물의 SFC(solid fat content) 분석

효소적 에스테르 교환 반응 생성물과 기존 유지제품의 고체지방지수(solid fat content, SFC) 경향을 비교분석함으로써 본 논문에 의해 제조된 유지가 기존의 유지와 물성이 유사하여 이를 대

Table 1. Coded levels for independent variables in developing experimental data

Coded X_i	Variable	Coded level		
		-1	0	1
X_1	Ratio of [FHCO]:[SO] ¹⁾ (w/w)	35:65	40:60	45:55
X_2	Reaction temperature (°C)	60	65	70
X_3	Flow rate (mL/min)	0.4	0.8	1.2

¹⁾FHCO, fully hydrogenated canola oil; SO, soybean oil

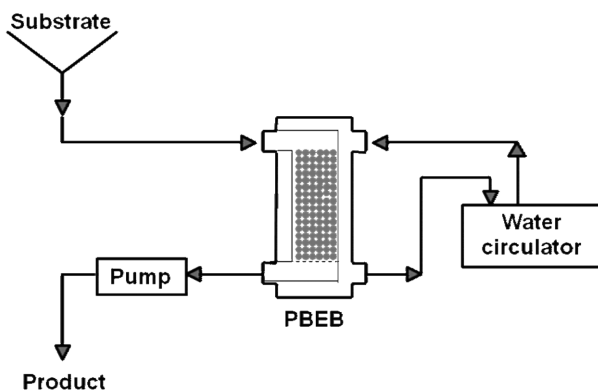


Fig. 1. Schematic diagram of the packed bed enzyme bioreactor (PBEB) used in this study.

채할 수 있는지의 여부를 판단하고자 하였다. 분석시료 3-5 g을 SFC 측정용 cell에 주입하고 10, 21.1, 26.7, 33.3, 37.8°C 등 각각의 다른 온도인 5 지점에서의 SFC를 측정하여 1개의 시료에 대한 SFC 경향으로 나타내었다. SFC는 (주)삼양웰푸드사(Samyang Well-food Corp., Incheon, Korea) 중앙연구소 내의 Brucker Corporation (Billerica, MA, USA)의 SFC 측정용 NMR analyzer를 사용하여 측정하였다.

RSM에 의한 연속식 효소적 에스테르 교환반응의 최적화

중심합성계획법에 따라 설계한 실험구(Table 2)에 의하여 도출한 결과인 TS 전환율을 최소제곱회귀에 의한 반응표면분석(response surface analysis by least square regression, RSREG)의 방법으로 통계분석을 실시하였으며(13-15), 3차원 분석을 통하여 연속식 효소적 에스테르 교환반응의 최적화를 실시하였다. 연속식 효소적 에스테르 교환반응의 최적화 과정에서의 독립변수인 원료유지내의 FHCO 함량(X_1 , %), 반응온도(X_2 , °C), 기질의 흐름속도(X_3 , mL/min)와 종속변수인 TS 전환율(Y)에 대한 표본회귀모형식은 다음과 같다.

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^3 b_i X_i + \sum_{i=1}^3 b_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 b_{ij} X_i X_j$$

여기서 Y는 종속변수, X_i , X_j 는 독립변수, b_0 는 절편, b_i , b_{ii} , b_{ij} 는 회귀계수이다.

결과 및 고찰

연속식 효소적 에스테르 교환반응의 경시적 변화

원료유지 중 FHCO함량이 45%, 60°C의 반응온도, 기질의 흐름속도를 0.4 mL/min으로 설정하여 효소적 에스테르 교환반응을 수행한 결과를 토대로 반응시간에 따른 TS 전환율의 변화 양상을 살펴보았다(Fig. 2). 초기에는 반응시간의 경과에 비례하여 TS 전

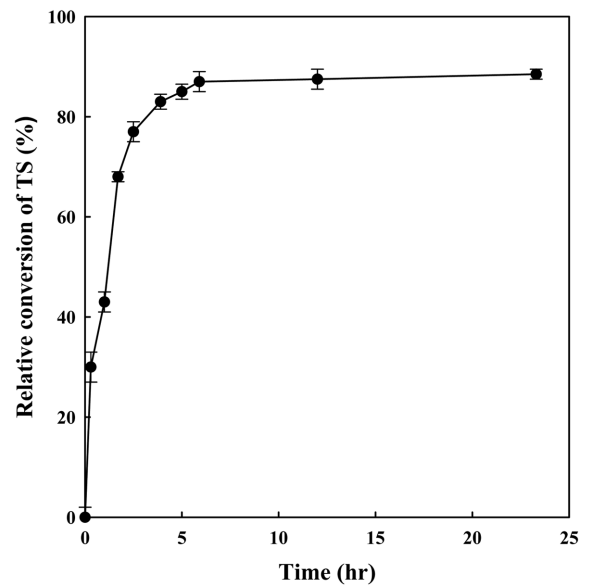


Fig. 2. Time course of relative conversion of TS during continuous lipase-catalyzed interesterification at initial stage in PBEB.

환율이 급격히 증가하여, 반응 6시간 경과시 최대의 TS 전환율을 나타내었으며, 그 이후부터 반응 24시간까지 전환율은 미약한 증감을 나타내며 87% 수준에서 평형상태를 유지하였다. Fig. 2의 측정시간 내에서는 나타나지 않았으나, 효소적 에스테르 교환반응 개시 후 일정시간이 경과하면 고정화효소의 활성 감소로 인해 점차적으로 우하향 곡선을 나타낼 것으로 예상하였다. 따라서 이 후의 실험에서는 Fig. 2의 결과를 기초로 하여 연속식 효소적 에스테르 교환을 위한 최적 조건을 확립하고자 하였다.

RSM에 의한 연속식 효소적 에스테르 교환반응의 변수간 관계 분석

중심합성계획법에 의하여 설계된 15개의 실험조건 하에서 TS 전환율을 측정한 결과를 Table 2에 나타내었으며, 이러한 결과를 바탕으로 RSREG 처리하여 Table 3을 완성하였다. 이때 3가지 독립변수(X_1 : 원료유지 중 FHCO 함량(%), X_2 : 반응온도(°C), X_3 : 기질의 흐름속도(mL/min))가 각각 변화함에 따른 종속변수(Y: TS 전환율)에 대한 회귀방정식은 아래와 같이 표현되었다.

$$Y = 93.1146(X_3)^2 + 3.2387(X_1) \cdot (X_3) + 2.6038(X_2) \times (X_3)$$

이때의 결정계수(coefficient of determination, R^2)는 0.858이며 유의성은 0.009로서 1% 이내의 유의수준에서 입증되었다. 여기에서 3가지 독립변수인 X_1 , X_2 , X_3 및 $(X_1)^2$, $(X_2)^2$, $(X_1) \cdot (X_2)$, constant 등과 같은 항목들의 p -value가 모두 0.2보다 큰 값으로서 이러한 요인들은 에스테르 교환반응에 직접적인 영향을 크게 미치지 못하는 것으로 나타나 회귀방정식에서 제외하였다.

TS 전환율 측면에서의 RSM에 의한 연속식 효소적 에스테르 교환반응을 위한 조건 최적화

임체적인 방법으로 연속식 효소적 에스테르 교환반응을 위한 조건을 최적화하기 위하여 정준분석(canonical analysis)을 수행하여 Fig. 3의 결과로 나타내었다. 암호화된 값(coded value)을 실제 값(uncoded value)으로 변환시켜 연속식 효소적 에스테르 교환반

Table 2. Central composite design consisting of 15 experiments for the study of three experimental factors in coded units

Run number	Coded variable ¹⁾			Process variable ²⁾		
	X_1	X_2	X_3	X_1	X_2	X_3
1	-1	0	-1	35	65	0.4
2	0	0	0	40	65	0.8
3	+1	-1	0	45	60	0.8
4	-1	0	+1	35	65	1.2
5	+1	0	-1	45	65	0.4
6	-1	-1	0	35	60	0.8
7	0	0	0	40	65	0.8
8	+1	0	+1	45	65	1.2
9	0	-1	+1	40	60	1.2
10	+1	+1	0	45	70	0.8
11	0	+1	+1	40	70	1.2
12	0	-1	-1	40	60	0.4
13	0	0	0	40	65	0.8
14	-1	+1	0	35	70	0.8
15	0	+1	-1	40	70	0.4

¹⁾²⁾ X_1 , ratio of [FHCO] (w/w); X_2 , reaction temperature (°C); X_3 , flow rate (mL/min)

Table 3. Response of independent variables to the experiment for relative conversion of TS

Run number	Coded variable ¹⁾			Dependent variable (Relative conversion of TS (%))
	X ₁	X ₂	X ₃	
1	-1	0	-1	96.47
2	0	0	0	92.51
3	+1	-1	0	81.68
4	-1	0	+1	84.77
5	+1	0	-1	87.76
6	-1	-1	0	95.71
7	0	0	0	90.65
8	+1	0	+1	50.15
9	0	-1	+1	44.54
10	+1	+1	0	92.65
11	0	+1	+1	63.01
12	0	-1	-1	93.77
13	0	0	0	91.66
14	-1	+1	0	94.60
15	0	+1	-1	91.41

¹⁾X₁, ratio of [FHCO] (w/w); X₂, reaction temperature (°C); X₃, flow rate (mL/min)

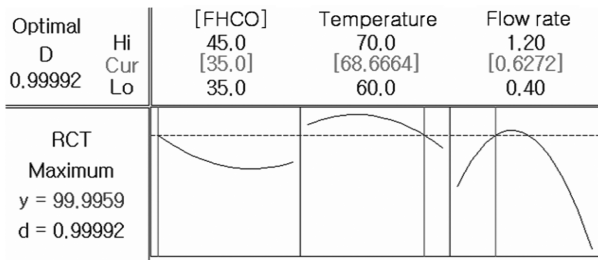


Fig. 3. Optimum conditions for continuous lipase-catalyzed interesterification with respect to the relative conversion of TS by response surface methodology.

응을 위한 최적조건으로 결정하였으며, 이러한 최적조건 하에서의 TS 전환을 최대 예측값은 99.99%로 산출되었다. 따라서 Fig. 3에 나타낸 실제값을 TS 전환을 측면에서의 연속식 효소적 에스테르 교환반응을 위한 최적조건으로 확립하였는데, 이 조건은 35%(w/w)의 FHCO와 65%(w/w)의 SO가 혼합된 원료유지를 사용하며 PBEB 내에서의 반응온도는 68.67°C이고, 효소와 원료유지가 완전히 접촉하여 효소적 에스테르 교환반응을 진행할 수 있도록 기질의 흐름속도를 0.63 mL/min로 유지하는 것이었다.

앞선 방식에 의해 설정된 최적조건은 TS 전환율을 판단기준으로 하여 구축된 결과로서 연속식 효소적 에스테르 교환반응 자체의 performance를 극대화하는 작업의 일환이며 이론적인 자료로 중요한 의미를 갖는다. 그런데, 산업체 현장에서 생산되는 기존의 유지를 대체하기 위해서는 효소적으로 생산된 에스테르 교환 유지의 물성을 측정하여 기존 유지의 결과와 비교·분석함으로써 대체 가능성 여부를 판단하는 보완작업이 필요하다. 따라서 TS 전환율을 종속변수로 하여 결정한 최적조건을 토대로 하여 변형하되, 유지의 물성 중 고체함량을 나타내는 전형적 지수인 SFC를 종속변수로 하는 최적화 작업을 수행하여 또 다른 최적조건을 확립함으로써 실제 산업체 현장에서 필요로 하는 무-트랜스 유지생산을 위한 조건을 최적화 하고자 하였다.

Table 4. Values of regression coefficient calculated for relative conversion of TS

Independent variable ¹⁾	Coefficient	T-value	P-value
Constant	27.8929	0.040	
X ₁	-16.5971	-1.235	
X ₂	12.0686	0.674	
X ₃	69.6208	0.556	
X ₁ X ₁	0.1232	0.935	
X ₂ X ₂	-0.1410	-1.070	
X ₃ X ₃	-93.1146	-4.522	< 0.2
X ₁ X ₂	0.1208	0.954	
X ₁ X ₃	-3.2387	-2.046	< 0.2
X ₂ X ₃	2.6038	1.645	< 0.2
R ²			0.858
F			10.44
Probability			0.009

¹⁾X₁, ratio of [FHCO] (w/w); X₂, reaction temperature (°C); X₃, flow rate (mL/min)

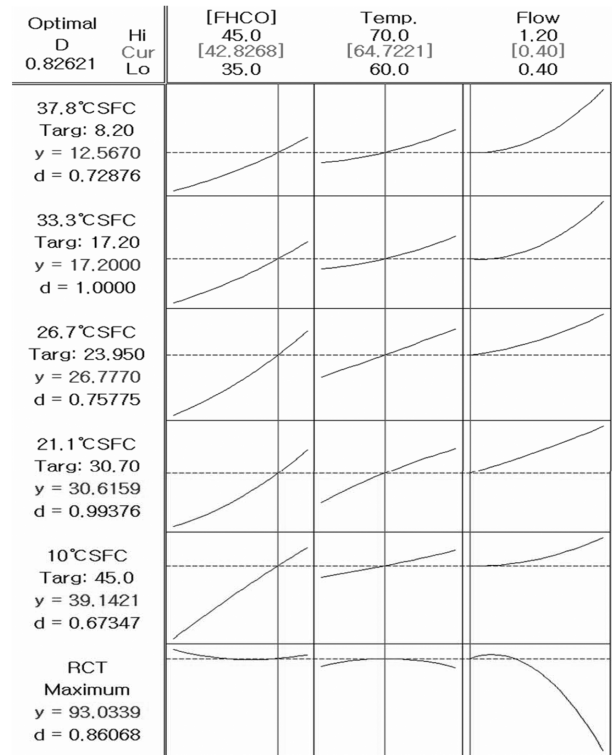


Fig. 4. Optimum conditions for continuous lipase-catalyzed interesterification with respect to the solid fat content by response surface methodology.

SFC 경향 측면에서의 RSM에 의한 연속식 효소적 에스테르 교환반응을 위한 조건 최적화

트랜스 지방의 함량이 높은 유지를 대체하되 실제 산업체 현장에서 생산되는 기존의 유지를 대체하기 위해서는 TS 전환율 뿐만 아니라 효소적으로 생산된 에스테르 교환 유지의 SFC 경향을 기존 유지의 결과와 비교하는 작업이 필요한데, 이때 비교 대상의 기존 유지로는 트랜스 지방 함량 및 이화학적 물성 측면에서의 예비실험 결과 대체 가능성이 가장 높은 크림용 마가린(margarine)을 선정하였다.

크림용 마가린을 대체할 수 있는 무-트랜스 유지를 제조하기 위하여 SFC 경향 및 TS 전환율을 동시에 고려한 연속식 효소적 에스테르 교환반응의 최적조건을 정준분석을 이행하여 확립하였으며, 그 결과를 Fig. 4에 나타내었다. Fig. 4의 최적조건 하에서 제조되는 유지의 최대 TS 전환율 예측값은 93.03%로 산출되었으며 이러한 TS 전환율 값은 경제성 측면에서도 이용가치가 높은 수치이므로 Fig. 4에서의 반응조건을 SFC 경향 및 TS 전환율을 동시에 고려한 연속식 효소적 에스테르 교환반응의 최적조건으로 확정하였다. 확정된 연속식 효소적 에스테르 교환반응의 최적조건은 42.83%(w/w)의 FHCO와 57.17%(w/w)의 SO가 혼합된 원료유지를 기질로 사용하며 PBEB 내에서의 반응온도는 64.72°C 이고, 효소와 원료유지가 극대도 접촉하여 효소적 에스테르 교환이 이루어질 수 있도록 기질의 흐름속도를 0.40 mL/min으로 각각 유지하는 것으로 판명되었다.

즉, SFC 경향 및 TS 전환율을 동시에 고려한 연속식 효소적 에스테르 교환반응의 최적조건은 TS 전환율만을 고려한 결과와는 차이를 보였는데, 특히 원료유지 내의 FHCO 함량과 원료유지의 흐름속도에서 각각 7.83(42.83-35.0)%(w/w) 및 0.23(0.63-0.40) mL/min 수준의 차이를 발생시켰다. 이러한 결과는 산업체에서 주로 사용하는 유지는 상온에서 고체로 존재하면서 가소성(plasticity)이 강한 특성을 갖추어야 하므로 연속식 효소적 에스테르 교환반응에서의 원료유지도 2가지의 물리적 특성이 강한 FHCO의 함량이 보다 높게 변환되어야만 하며, SFC 경향 및 TS 전환율을 동시에 고려한 경우의 반응온도가 TS 전환율만을 고려한 경우보다 3°C 낮게 결정됨에 따라 PBEB 내에서의 머무름 시간을 증가시켜야만 하므로 기질의 흐름속도는 0.23 mL/min의 수준으로 더 느리게 변해야하는 특성에 기인하는 것으로 판단하였다.

연속식 효소적 에스테르 교환반응에 의해 생성된 무트랜스 유지와 상용 유지의 SFC 비교분석

예비실험 결과, 산업체현장에서 상용되고 있는 유지 중 대체

가능성이 가장 높은 크림용 마가린(margarine)을 선정하였고, 최적화 반응조건에서 생성된 무-트랜스 유지와 크림용 마가린의 SFC 결과를 비교하여 Fig. 5에 나타내었다. 연속식 효소적 에스테르 교환반응에 의한 SFC 변화 양상을 알아보기 위해 대조군 실험은 고정화 효소를 제외한 모든 반응조건 동일하게 설정하여 병행하였다. 대조군의 경우, 설정온도가 10, 21.1, 26.7, 33.3, 37.8°C로 증가하는 동안 SFC는 35.0-28.5% 범위에서 미약한 감소를 보이며, 유의적인 변화를 보이지 않았다. 반면, 연속식 효소적 에스테르 교환반응에 의해 생성된 무-트랜스 유지는 동일한 설정온도에서 40.2, 22.1, 18.3, 11.8, 7.9%를 각각 나타내며 온도 상승에 따른 SFC가 단계적으로 감소하는 그래프를 나타내었다. SFC의 이러한 변화는 크림용 마가린의 양상과 비교했을 때 유사한 것이며, 이러한 결과는 생성된 무-트랜스 유지가 현재 일반적으로 상용되고 있는 트랜스지방 함유 유지를 대체할 가능성이 매우 높음을 시사하였다.

연속식 효소적 에스테르 교환반응의 안정성 분석

반응시간의 경과에 따른 고정화 효소의 활성감소는 필연적이므로 연속식 효소적 에스테르 교환반응의 안정성을 분석하고자 하였으며, 이를 위해 반응시간을 충분히 연장하여 TS 전환율을 측정하였다. SFC 측면에서의 최적화 반응조건으로 설정하고 반응개시 후 16일 경과 시점까지의 TS전환율을 측정하여 Fig. 6에 나타내었다. 반응 13일 경과시점까지 소폭 증감은 있지만 80% 이상의 효율적인 TS전환율을 유지했다. 이후에는 효소의 활성이 급격히 감소하여 15일 경과시점에서는 초기 TS전환율의 절반 수준으로 하락하는 양상을 나타내었다.

고정화효소의 활성이 절반으로 감소되는 반응시점을 반감기로 보고한 연구논문의 개념을 본 연구에 도입하여(16), 효소활성의 반감기가 15일 정도로 충분히 길지 못한 점을 보완하기 위해 연계적 실험으로 65°C의 단일한 반응온도 체계를 두 단계로 나누어 수행하였다. 기존의 PBEB의 용량을 절반으로 줄인 10 mL의

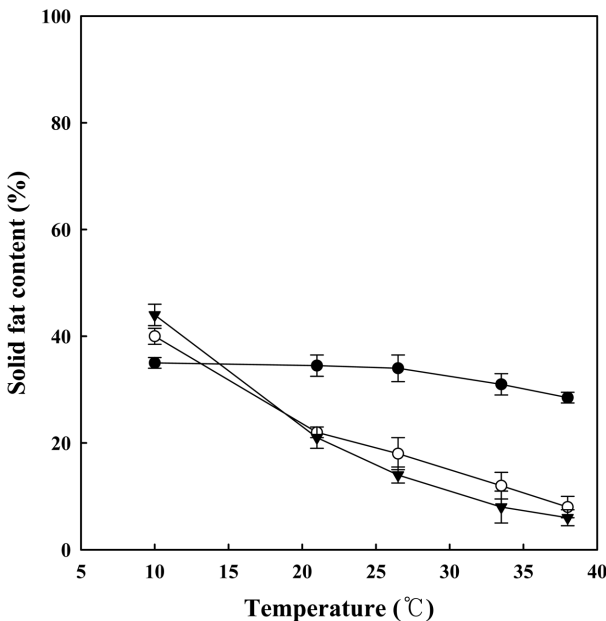


Fig. 5. Changes in solid fat content according to increase of temperature. (●, Control; ○, Trans-free fat produced from continuous lipase-catalyzed interesterification in PBEB; ▼, Cream margarine commonly used in industry)

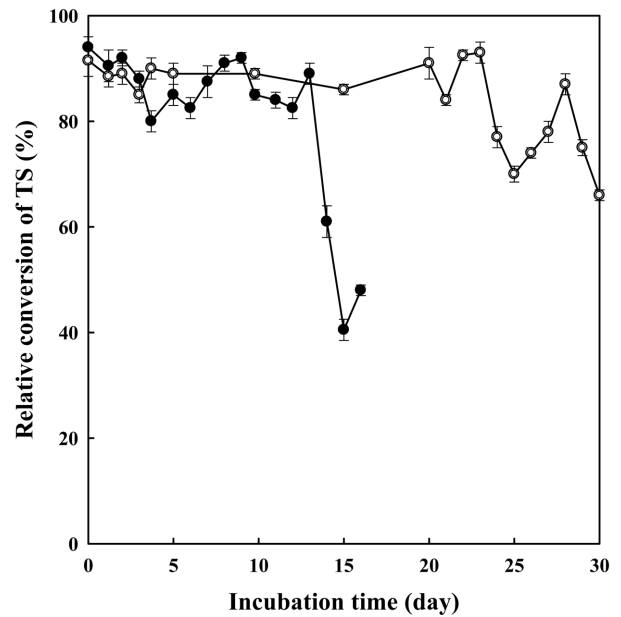


Fig. 6. Time course of relative conversion of TS during the continuous lipase-catalyzed interesterification in PBEB. (●, Immobilized lipase in PBEB with single stage; ○, Immobilized lipase in PBEB with two stages)

PBEB 두 개를 연결하여 총 머무름 시간을 동일하게 고정된 상태에서 반응온도를 60과 55°C로 각각 설정하여 반응단계를 분리하여 TS전환율 변화를 측정하였다(Fig. 6). 반응 30일 경과시점까지 66% 이상의 TS전환율을 유지하였으며, 이러한 결과는 단일단계의 반응온도 실험과 비교 시 반감기가 두 배 이상 연장된 수준이며, 유지 산업 현장에 적용 가능한 반응 안정성을 확보한 것으로 판단하였다.

요 약

연속식 효소적 에스테르 교환반응을 이용하여 무-트랜스 유지를 제조하기 위한 체계적이고 입체적인 최적조건을 확립하기 위하여 3가지 독립변수(X_1 : 원료유지 중 FHCO 함량(%), X_2 : 반응온도(°C), X_3 : 기질의 흐름속도(mL/min))를 선정하여 RSM을 통해 각각의 독립변수에 대한 종속변수인 TS 전환율(Y)을 표현한 회귀방정식은 $Y = 93.1146(X_1)^2 + 3.2387(X_1) \cdot (X_2) + 2.6038(X_2) \cdot (X_3)$ 으로 나타났다. 이 방정식을 이용하여 정준분석을 이행한 결과 35%(w/w)의 FHCO를 함유한 원료유지를 사용하고 PBEB 내에서 68.67°C의 온도 하에서 원료유지와 효소가 충분히 접촉할 수 있도록 0.63 mL/min의 흐름속도로 연속식 공정을 수행하면 TS 전환율이 극대화 되는 것으로 나타났다. 한편, 트랜스 지방의 함량이 높은 유지를 대체하되 실제 산업체 현장에서 생산되는 기존의 유지를 대체하기 위해서는 TS 전환율 뿐만 아니라 효소적으로 생산된 에스테르 교환 유지의 SFC 경향을 기존 유지의 결과와 비교하는 작업이 필요한데, 이때 비교대상의 기존 유지로는 트랜스 지방 함량 및 이화학적 물성 측면에서의 예비실험 결과 대체 가능성이 가장 높은 크림용 마가린(margarine)을 선정하였으며, 이러한 기존의 유지를 대체할 수 있는 무-트랜스 유지를 제조하기 위하여 SFC 경향 및 TS 전환율을 동시에 고려한 연속식 효소적 에스테르 교환반응의 최적조건을 확립하였으며, 최적조건은 42.83%(w/w)의 FHCO와 57.17%(w/w)의 SO가 혼합된 원료유지를 기질로 사용하며 PBEB 내에서의 반응온도는 64.72°C이고, 효소와 원료유지가 극대로 접촉하여 효소적 에스테르 교환이 이루어질 수 있도록 기질의 흐름속도를 0.40 mL/min으로 각각 유지하는 것으로 판명되었다.

이상의 최적조건 하에서 연속식 효소적 에스테르 교환반응에 의해 제조된 유지의 SFC 경향을 분석하되 기존의 크림용 마가린의 경우와 비교한 결과 유의적으로 유사함을 확인하였으며, 이로써 본 논문에 의해 생산된 유지는 크림용 마가린을 성공적으로 대체할 수 있는 것으로 판단하였다. 또한, 반응온도를 60°C 및 55°C로 각각 설정하여 2 단계로 분리한 PBEB에서의 TS전환율 변화를 측정한 결과, 반응 30일 경과시점까지 66%이상의 TS전환율을 유지하였으며(효소활성 반감기=약 30일 이상), 단일단계의 반응온도 실험(효소활성 반감기=약 15일)과 비교 시 반감기를 두 배 이상 연장할 수 있음을 확인하였다.

문 헌

- Mensink RP, Katan MB. Effect of dietary trans fatty acids on high-density and low-density lipoprotein cholesterol levels in healthy subjects. *New Engl. J. Med.* 324: 338-340 (1991)
- Chardigny JM, Dionisi F, Bauman DE, German B, Mensink RP, Combe N, Barbano DM, Enjalbert F, Cristiani I, Moulin J, Boirie Y, Golay PA, Giuffrida F, Destaillets F. A study to assess the effect of the two different dietary sources of *trans* fatty acids on cardiovascular risk factors in humans. *Contemp. Clin. Trials.* 27: 364-373 (2006)
- Han SN, Leka LS, Lichtenstein AH, Ausman LH, Schaefer EJ, Meydani SN. Effect of hydrogenated and saturated, relative to polyunsaturated, fat on immune and inflammatory responses of adults with moderate hypercholesterolemia. *J. Lipid Res.* 43: 445-452 (2002)
- Hunter JE. Dietary levels of trans-fatty acids: basis for health concerns and industry efforts to limit use. *Nutr. Res.* 25: 499-513 (2005)
- Konishi H, Neff WE, Mounts TL. Chemical interesterification with regioselectivity for edible oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 70: 411-415 (1999)
- Seriburi V, Akoh C. Enzymatic interesterification of lard and high-oleic sunflower oil with *Candida antarctica* lipase to produce plastic fats. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75: 1339-1345 (1998)
- Farmani J, Hamed M, Safari M, Madadlou A. Trans-free Iranian vanaspati through enzymatic and chemical transesterification of triple blends of fully hydrogenated soybean, rapeseed, and sunflower oils. *Food Chem.* 102: 827-833 (2007)
- Ha JW. Preparation of low *trans*-fat by lipase-catalyzed interesterification. MS thesis, Seoul National University of Technology, Seoul, Korea (2007)
- Sehanputri PS, Hill Jr CG. Lipase-mediated acidolysis of butter oil with free conjugated linoleic acid in a packed bed reactor. *Biotechnol. Bioeng.* 83: 608-617 (2003)
- Cho EJ, Lee JH, Lee KT. Optimization of enzymatic synthesis condition of structured lipids by response surface methodology. *Korean J. Food Sci. Technol.* 36: 531-536 (2004)
- Kubow S. The influence of positional distribution of fatty acids in native, interesterified, and structure-specific lipids on lipoprotein metabolism and atherogenesis. *J. Nutr. Biochem.* 7: 530-541 (1996)
- Pfeuffer M, Greyt W, Schoppe I, Barth C, Huyghebaert A. Effect of interesterification of milk fat on plasma lipids of miniature pigs. *Int. Dairy J.* 5: 265-273 (1995)
- Baek HH, Cadwallader KR. Enzymatic hydrolysis of cray-fish processing by-products. *J. Food Sci.* 60: 929-935 (1995)
- SAS Institute, Inc. SAS user's guide. Statistical Analysis System Institute, Cary, NC, USA (1990)
- Park J, Rhee KS, Kim BK, Rhee KC. Single-screw extrusion of defatted soy flour, corn starch and raw beef blends. *J. Food Sci.* 58: 9-20 (1993)
- Chang PS, Rhee JS, Kim JJ. Continuous glycerolysis of olive oil by *Chromobacterium viscosum* lipase immobilized on liposome in reversed micelles. *Biotechnol. Bioeng.* 38: 1159-1165 (1991)
- Kwon DY, Casa EP, Pham LJ. Lipase-catalyzed interesterification of tripalmitin and capric acid in non-aqueous system. *Food Sci. Biotechnol.* 5: 349-352 (1996)