J Korean Soc Food Sci Nutr
45(4), 533~541(2016)

한국식품영양과학회지
http://dx.doi.org/10.3746/jkfn.2016.45.4.533

pH-Stat Digestion Model에서 카카오 추출물이 Oil과 Emulsion의 가수분해에 미치는 영향

이지현 · 신정아 · 이기택
충남대학교 식품공학과

Effect of Cacao Extract on Hydrolysis of Oil vs. Emulsion in pH-Stat Digestion Model

Ji-Hyun Lee, Jung-Ah Shin, and Ki-Teak Lee
Department of Food Science and Technology, Chungnam National University

ABSTRACT Effect of polyphenols-rich cacao extract (CE) on lipid hydrolysis by pancreatic lipase was investigated by pH-stat digestion. Two types of substrate (oil vs. emulsion) prepared from soybean oil and CE were studied as types Ⅰ and Ⅱ. In the case of type Ⅰ, addition of CE did not show retardation of lipid hydrolysis, showing that pancreatic lipase was not inhibited. Final digestibility rate (Φ max, %) and initial rate (mM/s) of the 24-h aged control (52.31%, 0.03 mM/s) were similar to those of the CE-added sample (58.88%, 0.03 mM/s). However, in the case of type Ⅱ, the hydrolysis rates of the control and CE-added emulsion showed distinct differences as aging time increased to 43 days, showing lower digestion in the CE-added emulsion than the control. After 43 days, Φ max values of the control and CE-added emulsion were 92.13% and 77.68%, respectively.

Key words: cacao extract, phenol compound, pH-stat digestion, hydrolysis, emulsion

서 론

2013년 국민건강영양조사 결과에 따르면 미국의 비만 유병률은 1999년에서 2006년 사이 34.2% 증가하였으며, 국내에서 비만 유병률은 2007년 31.3%로 증가하였다(1). 비만은 고혈압, 고지혈증과 같은 심혈관 질환 및 제2형 당뇨병 등 여러 질병 발생과 관련성이 높다(2). 특히 지방은 식품 영양 성분 중에 가장 높은 열량을 가지고 있으므로 지방 섭취량을 제한하거나 장에서의 지방 흡수를 저해하는 것이 비만을 예방할 방법이다. 췌장에서 분비되는 pancreatic lipase는 지방 흡수에 중요한 효소이며 이 효소의 작용 없이 지방이 직접 체내로 흡수되지 못하기 때문에 활성을 저해한다면 지방 흡수를 감소시킬 수 있다(3,4).

한편 유화액의 구조와 안정성은 지방 소화 흡수에 중요한 요소일 수 있다. 유화액의 계면장력, 두께, 구성 등의 계면 특성을 조절하여 지방 소화 과정을 조절할 수 있으며, 높은 표면 활성을 가진 계면활성제를 사용하여 장내의 다른 표면 활성물질(담즙산, pancreatic lipase 등)이 지방구에 흡착되는 것을 일부 방해하거나 particle이 계면에 박혀 물리적 안정성이 높은 유화액을 형성함으로써 지방 소화를 조절할 수 있다(5,6).

현재까지 lipase의 활성 저해를 목적으로 다양한 물질들을 스크리닝하여 chitosan, chondroitin sulfate, *Salacia reticulate*의 polyphenol 물질, 포도씨 추출물 등과 같은 lipase 저해 물질들이 보고되었고, 우롱차 추출물, 녹차 추출물 및 베리류 추출물이 α-amylase, α-glucosidase 및 pancreatic lipase를 저해한다고 알려졌다(3,4,7). McDougall 등(8)은 polyphenol이 풍부한 식물 추출물에 의한 pancreatic lipase의 저해 효과는 자연식을 통해 비만 예방에 접근할 수 있는 근거가 되고 있다고 하였다.

카카오(*Theobroma cacao*)는 polyphenol의 함량이 높다고 알려졌으며(9), 카카오 추출물이 pancreatic α-amylase, pancreatic lipase 등 소화 효소를 저해하는 것으로 보고되었다(10). 카카오의 주요 phenol 화합물은 monomers(catechin, epicatechin), epicatechin-(4β→8)-catechin(procyanidin B1), epicatechin-(4β→8)-epicatechin (procyanidin B2) 등의 dimers와 [epicatechin-(4β→8)] 2-epicatechin(procyanidin C1)과 같은 trimmers 등이다(11,12).

본 실험에서는 폐놀화합물의 함량이 높다고 알려진 카카오(powder)로부터 카카오 추출물(cacao extract, CE)을 획득한 후, CE가 pancreatic lipase의 활성에 미치는 영향과 CE를 함유한 emulsion의 aging에 의한 가수분해율 변화

Received 23 November 2015; Accepted 12 February 2016
Corresponding author: Ki-Teak Lee, Department of Food Science and Technology, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea
E-mail: ktlee@cnu.ac.kr, Phone: +82-42-821-6729

를 살펴보았고, 이를 위하여 pH-stat digestion model을 이용하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 시약

본 연구에서 추출에 사용된 hexane과 ethanol은 normal-grade를 사용하였고, 추출물 정제에 사용한 HP-20 resin은 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 소화액 제조에 사용된 시약 및 효소 pancreatic lipase(type Ⅱ, crude)는 Sigma-Aldrich Co.에서 구입하여 사용하였다.

카카오 분말에서 페놀화합물 추출

카카오 분말에서 페놀화합물을 추출하기 위해 먼저 지질을 제거하였다. 스크롤 캡이 있는 삼각 플라스크에 시료 50 g을 취하여 500 mL의 hexane을 가하고, shaking water bath(55°C, 135 rpm)에서 30분 동안 추출하였다. Hexane이 시료와 분리될 때까지 방치한 후에 hexane층을 제거하였는데 이를 세 번 반복하여 지질을 제거한 다음 질소가스를 사용하여 남아있는 hexane을 모두 제거하였다. 탈지된 시료에 80% 에탄올을 250 mL 혼합하여 55°C에서 135 rpm의 shaking water bath를 이용하여 1시간 동안 추출하였다. 추출이 끝난 후 시료와 용매를 분리하고, 용매층을 filter paper로 걸러 둥근 플라스크에 옮겼다. 위의 반응을 4번 반복하여 추출하였으며, 감압농축기를 사용하여 용매를 완전히 제거한 뒤 카카오 추출물의 무게를 측정하였다. 페놀화합물의 불순물을 제거하기 위해 HP-20 column을 사용하였는데 HP-20 resin 50 g(추출물 2.5 g기준)을 80% 에탄올에 침지시켜 놓은 후 glass column 관의 입구를 솜으로 막고 sea sand 5 g을 넣어 column에 밀착시켰다. 침지시켜 둔 HP-20 resin을 column에 넣고, 추출물을 80% 에탄올에 녹여 resin 상부에 분사하고 45분간 방치하였다. 여기에 80% 에탄올 300 mL를 흘려주어 둥근 플라스크에 받았으며, 감압농축기를 사용하여 용매를 제거하고 동결건조를 통해 카카오 추출물을 분말 형태로 얻었다. 카카오 추출물의 총페놀 함량은 50.5 mg GAE/g CE였다.

Oil-water(O/W) 유화액 제조

카카오 추출물이 함유된 O/W 유화액을 제조하여 aging time(방치 기간)에 따른 유화액의 안정도와 pancreatic lipase의 지방 소화 활성 변화를 살펴보았다. 유화액은 20 mM bis-tris buffer(pH 7)와 soybean oil을 9:1(w/w) 비율로 준비하고 유화제로 Tween 20를 0.1% 첨가하였으며, 유화액의 부패 방지를 위해 bis-tris buffer 제조 시 sodium azide 0.02%를 첨가하였다. CE는 0.1% 첨가하여 추출물이 첨가되지 않은 유화액과 비교 실험하였다. 유화액은 silverson mixer(Model L4RT, Silverson Machines Ltd., Chesham, UK)를 사용하여 5,000 rpm에서 2분간 예비 균질화를 거친 후에 고압균질기(M-100Y, Microfluidics, Westwood, MA, USA)를 사용하여 3,000 psi에서 2회 균질화를 반복하여 제조하였다.

지방구 크기 측정

지방구의 크기는 입도분석기(Mastersizer S, Malvern Instrument, Worcestershire, UK)를 사용하여 측정하였으며 0, 2, 4, 7, 18, 43일마다 분석하였다. 그 결과는 아래의 식에 의해 계산되어 얻어진 volume surface mean diameter(d_{32})와 weighted average mean diameter(d_{43})로 나타냈다.

$d_{32}=\sum d^3_i n_i / \sum d^2_i n_i$

$d_{43}=\sum d^4_i n_i / \sum d^3_i n_i$

n_i: number of droplet of diameter

d_i: numbers of droplets size

Serum층 측정 및 현미경 관찰

Serum층을 관찰하기 위해 유화액을 제조 후 눈금이 그려진 5 mL vial에 옮겼다. Serum층 측정은 유화액이 들어 있는 vial 뒷면에 흰색 배경지를 두고 육안으로 높이를 측정하였다.

$$\text{Serum layer ratio (\%)}=\frac{\text{Serum layer (cm)}}{\text{Total layer (cm)}}\times 100$$

또한 광학현미경(Olympus CX21, Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan)을 사용하여 유화액의 지방구를 육안으로 확인하였다.

pH-stat digestion model

실험 방법은 Versantvoort 등(13)의 방법을 일부 변형하였으며 모든 소화액은 실험 당일 제조하여 사용하였다(Table 1). 기질 형태(oil 또는 emulsion 형태)에 따라 실험 방법을 type Ⅰ과 Ⅱ로 나누었는데, type Ⅰ은 soybean oil(oil 형태)을 소화액과 유화 시에 CE를 넣어 유화액을 제조하였고, type Ⅱ는 soybean oil을 Tween 20와 CE를 혼합하여 micro-emulsion(emulsion 형태)으로 만든 후 이를 digestion model에서 평가하였다. 따라서 soybean oil이 oil 형태이거나 emulsion 형태로 가수분해율 변화가 측정되었다.

Type Ⅰ: 100 mL 비커에 혼합 juice 35 mL를 취한 뒤 여기에 SBO 300 mg과 CE 500 ppm을 넣고 1분 동안 ultrasonic processor(GE 750, Sonics & Materials, Inc., Newtown, CT, USA)를 사용하여 유화액을 만들었다. 유화액을 적정기기에서 효소용액 1 mL를 첨가한 후 반응조건에서 10분 동안 가수분해하였다. CE를 첨가하지 않은 유화액을 대조군으로 하였으며, 유화액을 제조한 후 aging time(0, 5, 24시간)에 따른 가수분해율 변화를 비교하였다.

Type Ⅱ: 100 mL 비커에 혼합 juice 35 mL를 취한 뒤

Table 1. Composition of duodenal juice and bile juice for pH-stat digestion

	Duodenal juice	Bile juice
Inorganic solution[1)]	40 mL NaCl 175.3 g/L 40 mL $NaHCO_3$ 84.7 g/L 10 mL KH_2PO_4 8 g/L 6.3 mL KCl 89.6 g/L 10 mL $MgCl_2$ 5 g/L	30 mL NaCl 175.3 g/L 68.3 mL $NaHCO_3$ 84.7 g/L 4.2 mL KCl 89.6 g/L
Organic solution	4 mL urea 25 g/L	10 mL urea 25 g/L
Add to mixture organic+ inorganic solution	9 mL $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 22.2 g/L 1 g BSA	10 mL $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 22.2 g/L 1.8 g BSA 30 g bile salt
pH	8.1±0.2	8.2±0.2

[1)]Each prepared juice was filled up to 500 mL with distilled water. Then other materials were added. HCl solution was used to adjust pH.

여기에 방법 3에 제시된 조건으로 만들어진 O/W micro-emulsion(oil 10%)을 3 mL 첨가하였다. 이를 적정기기에서 효소용액 1 mL를 첨가한 후 반응 조건에서 10분 동안 가수분해를 진행하였으며, CE를 첨가하지 않고 만들어진 micro-emulsion을 대조군으로 하였다. O/W micro-emulsion을 제조한 후 aging time(0, 2, 4, 7, 18, 43일) 동안 각각 가수분해하여 비교하였다.

모든 실험에 사용된 소화액은 Table 1에 제시된 조건으로 duodenal juice와 bile juice를 각각 제조하였으며 이를 각각 2:1로 혼합하였다. 기질의 가수분해를 위해 pancreatin 54 mg, lipase 36 mg을 혼합된 juice 1 mL에 녹여 사용하였으며, 가수분해는 37°C와 150 rpm의 조건에서 진행되었다. 또한 가수분해 결과로 생성된 free fatty acid(FFA)의 양은 potentiometer automatic titrator(AT-40E, Kyoto Electronics MFG. Co., Ltd., Kyoto, Japan)와 auto piston buret(APB-410, Kyoto Electronics MFG. Co., Ltd.)을 사용하여 0.05 N NaOH 용액으로 적정하였다. 모든 pH-stat digestion model의 결과는 아래의 식을 사용하여 적정에 사용된 NaOH의 양(mL)을 통해서 가수분해 결과 생성된 FFA의 양을 μM 단위로 나타내었다.

$$\text{생성된 FFA}(\mu M) = \text{적정된 NaOH}(mL) \times \text{NaOH의 몰농도} \times 1{,}000 \times \frac{300}{\text{시료 무게}(mg)}$$

가수분해율 측정

p기질로부터 가수분해된 FFA의 양(μmole)을 계산한 후 이를 기질로부터 분해되어 방출될 수 있는 총 FFA의 양에 대한 비율로 가수분해율(hydrolysis rate, %)을 나타내었다. 가수분해 반응에 대한 비교를 위해 다음과 같은 parameter(Φ max, k value, $t_{1/2}$, initial rate)를 사용하였다. Φ max, k value, $t_{1/2}$은 Li와 McClements(14)의 연구를 참고하였으며, initial rate는 아래의 식을 이용하였다.

Φ max(%)는 지방구 안에 존재하는 FFA의 몰수에 대한 가수분해 반응 동안(10분) 생성된 FFA의 몰수의 비율을 의미하며, k value는 속도 상수(μmole/s/m^2)로써 지방구의 단위 표면적당 초당 방출되는 FFA의 μmole수로 정의하였다. $t_{1/2}$은 최대반응의 50%의 반응이 일어나는 데 걸리는 시간을 의미하며, initial rate는 초당 방출되는 FFA의 농도(mM/s)로 나타내어 digestion 속도를 표현하였다.

$$\text{Initial rate (mM/s)} = \frac{\text{Released FFA amount until 1 min (μmole)}}{\text{Total volume (mL)}} \div 60$$

결과 및 고찰

추출된 페놀화합물

카카오 분말로부터 80% 에탄올을 사용해서 추출된 추출물의 수율은 15.9 wt%였으며, 이를 HP-20 column을 통해 순도를 높인 추출물(cacao extract, CE)의 수율은 12.0 wt%였다. 카카오의 polyphenols는 주로 flavan-3-ols epicatechin, catechin 및 (epi)catechin 단위체로 이루어진 oligoneric과 polymeric procyanidins로 구성되어 있다고 알려졌다(15).

카카오 추출물이 oil의 가수분해에 미치는 영향(type Ⅰ)

Type Ⅰ은 카카오 추출물을 기질(soybean oil)과 함께 소화액에 첨가하는 방법으로 수행하였다. CE를 첨가한 시료(CE)와 첨가하지 않은 시료(control)를 비교하여 실험하였으며, ultra-sonicator를 사용하여 emulsion 제조 후에 aging time(0, 5, 24시간)에 따른 가수분해율을 비교하였다(Fig. 1). Aging time에 따른 가수분해 경향은 control과 CE 사이에 큰 차이를 보이지 않았으며, aging time이 증가할수록 전체적인 가수분해율은 감소하는 경향을 보였다. Emulsion을 제조하고 바로(aging time: 0시간) digestion 실험을 한 결과, control과 CE는 1분에서 약 40%의 가수분해가 진행되었고 8분까지 일정한 비율로 100% 가까이 가수분해되었으며, 그 이후에는 더 이상 증가하지 않았다. pH-stat digestion parameter(Table 2)를 살펴보면 Φ max가 control의 경우에는 105%, CE는 102%로 뚜렷한 차이가

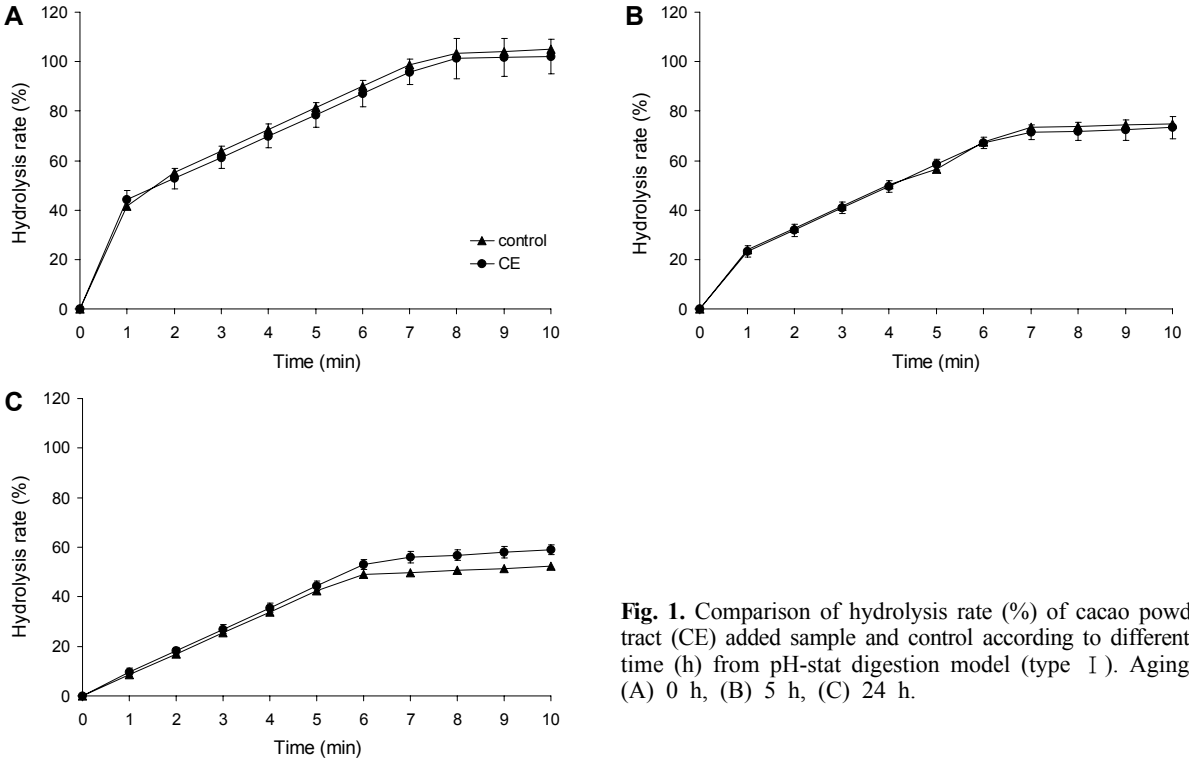

Fig. 1. Comparison of hydrolysis rate (%) of cacao powder extract (CE) added sample and control according to different aging time (h) from pH-stat digestion model (type Ⅰ). Aging time: (A) 0 h, (B) 5 h, (C) 24 h.

Table 2. Parameters from pH-stat digestion model (type Ⅰ)

Time (h)		Consumed NaOH (mL)	Released FFA (μmol)	Φ max[1)] (%)	Initial rate[2)] (mM/s)
0	Control	17.00	722.86	105.12	0.11
	CE[3)]	17.19	707.29	102.13	0.12
5	Control	15.28	513.96	74.81	0.07
	CE	14.21	503.06	73.33	0.07
24	Control	11.24	365.32	52.31	0.03
	CE	10.32	406.29	58.88	0.03

[1)] $\Phi\ \max\ (\%)=\frac{V_{NaOH}\ (10\ min)\times M_{NaOH}}{\text{Oil weight/Mw}\times 2\times 10^3}\times 100$

[2)] $\text{Initial rate (mM/s)}=\frac{\text{Released FFA amount until 1 min (μmole)}}{\text{Total volume (mL)}}\div 60$

[3)] CE: cacao extract was added.

없었고, initial rate의 경우에도 control과 CE가 각각 0.11 mM/s와 0.12 mM/s로 큰 차이가 없었다. Emulsion 제조 후 aging time이 5시간인 경우 control과 CE는 1분에서 약 20%가 가수분해되었고 7분까지 꾸준히 증가하였으며 그 이후에는 더 이상 증가하지 않았다. 이때 Φ max는 control은 74.81%, CE는 73.33%로 aging time이 0시간에 비해 감소한 결과를 보였다. Aging time이 24시간인 경우에도 가수분해율이 낮아졌는데, 0~6분 동안 일정한 변화율로 증가하였으며 6분 이후로 거의 변화가 없었다. Φ max의 경우 control 52.31%, CE 58.88%로 낮은 가수분해율을 나타내었다. Initial rate 또한 control과 CE 모두 0.03 mM/s로 유의적 차이가 없었다. 이는 지방구 크기가 큰 emulsion이 지방구 크기가 작은 emulsion보다 가수분해율이 낮아지고 속도도 감소한다는 연구(7,14)와 관련이 있는 것으로 생각된다. Aging time(5, 24시간)에 따라 유화액의 안정도가 낮아져 지방구 크기가 크게 변화하게 되면서 control과 CE 모두 가수분해율이 낮게 나타난 것으로 생각된다. 유화액은 제조 후 시간이 지날수록 지방구가 emulsion 표면에 집적되며 지방구의 합일과 응집 때문에 지방구의 크기가 증가하면서 emulsion의 안정도가 낮아지고(16,17), 유화액의 안정도가 낮아지면서 지방구 크기가 커지면 가수분해에도 영향을 준다(7,14). 한편 첨가한 약산성 페놀 추출물의 양은 소량(500 ppm)이나 이들에 의한 pH-stat 결과에 대한 영향도 차후 고려해 보아야 할 것으로 판단된다.

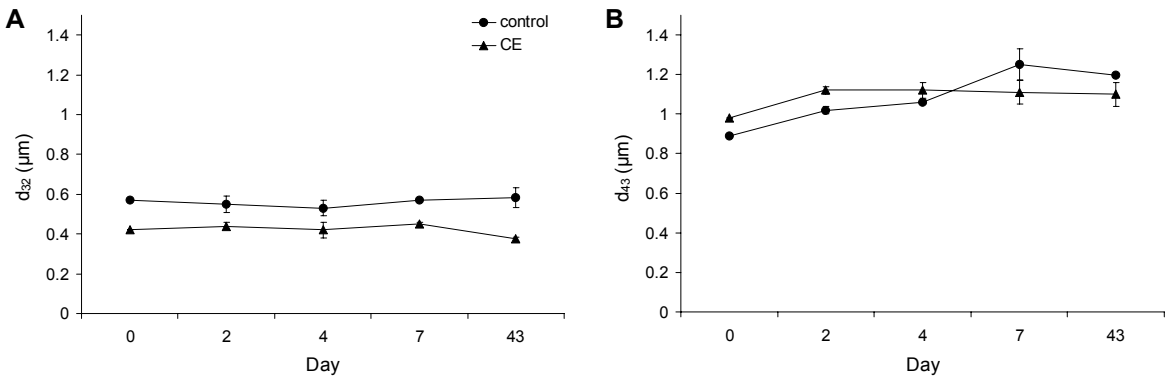

Fig. 2. Average droplet size of cacao powder extract-added (CE) O/W emulsion and control according to different aging time. (A) d_{32}: volume-surface average diameter, (B) d_{43}: volume-weighted average diameter.

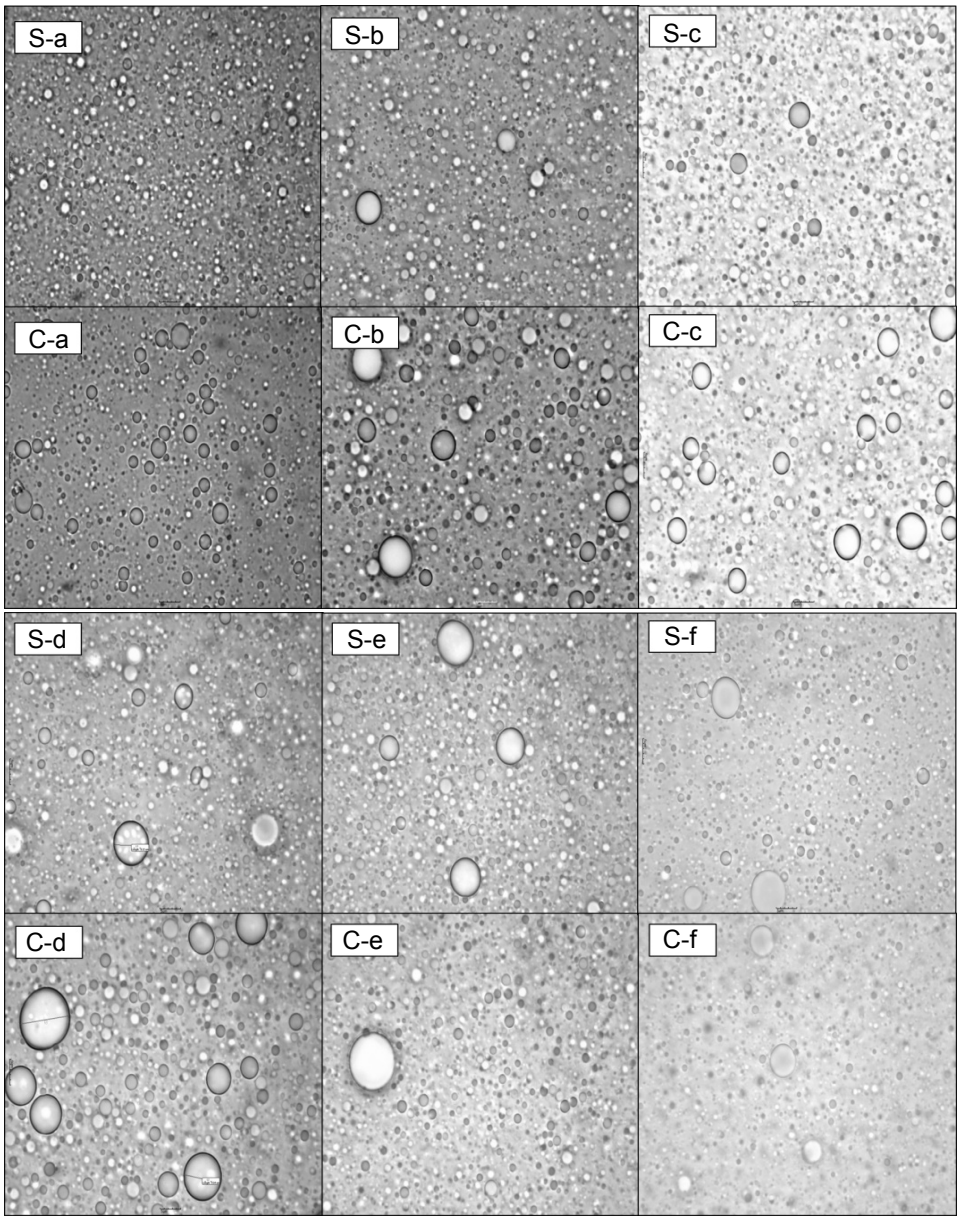

Fig. 3. Microscopic observation (×1,000) of oil droplets of cacao powder extract-added (C) O/W emulsion and control (S) according to different aging time (a, b, c, d, e, and f; 0, 2, 4, 7, 18, and 43 day).

O/W 유화액의 지방구 크기

Type Ⅱ에 의해 제조된 emulsion의 aging time에 따른 지방구 크기 변화를 Fig. 2에 제시하였다. 유화액을 제조한 당일 지방구의 d_{32}값은 control이 0.57 μm, CE가 0.42 μm로 CE가 control보다 작은 값을 보였다. 그 후 aging time (2, 4, 7, 43일)이 길어짐에도 control은 0.53~0.58 μm를 보였고, CE는 0.38~0.45 μm로 큰 변화를 보이지 않았다. 한편 d_{43}값의 경우에는 유화액 제조 0일에는 control이 0.89 μm, CE는 0.98 μm로 CE가 높은 값을 보였으나 aging time (2, 4, 7, 43일)에 따라 CE의 경우 1.10~1.12 μm로 0일과 큰 차이가 없었으며, control의 경우 1.02~1.25 μm의 범위를 보이며 7일 이후로는 control의 d_{43}값이 CE보다 높게 나타났다. CE emulsion이 control에 비해 작은 지방구 크기를 보이는 것으로 보아 더 안정적인 유화액을 형성하고 있다고 생각한다(16,17).

유화액의 안정성

지방구 크기의 변화를 광학현미경을 이용하여 더욱 자세히 관찰하고자 하였다(Fig. 3). Aging time이 길어지면서 CE를 첨가한 것과 control의 현미경 측정 결과 합일(coalescence)에 의해 생긴 큰 지방구들이 보였으며 CE와 control의 지방구 크기와 분포가 큰 차이 없게 관측되었다. 시간이 흐르면서 유화액의 지방구가 상부로 이동하여 상층에는 크림층이 형성되고, 하층에는 투명층이 형성되는데 이를 serum층이라 한다. 지방구 입자가 집적된 층은 빛이 산란하여 통과하지 않지만 지방구가 적은 층은 빛이 통과하게 된다(16,17).

유화액을 제조한 후 눈금이 그려진 10 mL vial에 일정량 취하여 aging time에 따른 유화액의 안정도를 평가하였다(Fig. 4). 4일까지는 control와 CE의 serum layer가 관측되지 않았으나 7일에 control의 serum layer가 2.44%로 관측되기 시작하여 18일에 9.76%, 24일에 24.39% 나타났다. 반면 카카오 추출물이 첨가된 CE emulsion의 serum layer는 18일에 4.8%로 관측되었고 43일에는 12.2%로 증가하였다. 따라서 CE의 serum layer가 control보다 낮은 경향을 보였고, 이는 CE를 첨가한 emulsion이 control보다 더 안정적이라는 것을 의미한다.

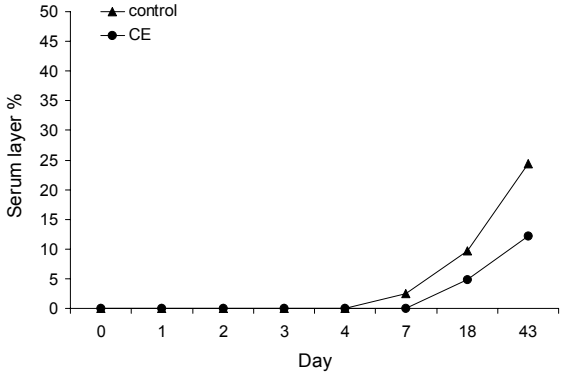

Fig. 4. Serum layer ratio (%) of cacao powder extract-added (CE) O/W emulsion and control according to different aging time.

카카오 추출물이 O/W emulsion의 가수분해에 미치는 영향 (type Ⅱ)

Type Ⅱ에서는 제조된 emulsion을 3 mL(10% oil 함유) 첨가하여 pancreatic lipase의 활성을 평가하였다. 더욱 안정한 emulsion을 제조하기 위해 유화제(Tween 20)를 첨가하고 micro-fluidizer를 사용하였다. 따라서 지방구는 Tween 20로 유화된 상태로 lipase의 가수분해가 진행되었고 0, 2, 4, 7, 18, 43일의 aging time에 따른 변화를 관찰하였다(Fig. 5). Aging time이 길어짐에 따라 control과 CE-emulsion의 최대 가수분해율(Φ max)이 낮아지는 경향을 보였으며, control과 CE-emulsion의 가수분해율의 차이가 나타났다. 0일의 가수분해 결과 control과 CE-emulsion 모두 2분까지 급격히 증가한 뒤, 8분까지 일정한 속도로 증가하여 최대 가수분해율에 도달하였고, control과 CE-emulsion 간의 가수분해 차이는 거의 보이지 않았다. 반면에 2~18일에 얻어진 가수분해 결과에서는 반응이 시작되고 6~7분까지는 카카오 추출물을 첨가한 CE-emulsion의 가수분해율이 다소 높았으나, 그 이후로는 CE-emulsion의 가수분해율이 더 이상 증가하지 않아 8분 이후로는 control의 가수분해율보다 낮았다. 특히 43일에는 CE-emulsion이 control의 가수분해율보다 큰 차이를 보이며 낮았다.

Micro-emulsion을 제조하여 aging time에 따른 가수분해 결과를 parameter로 Table 3과 4에 제시하였다. 10분 동안 가수분해된 FFA 양(μmole)의 경우 0일에서 control은 661.13 μmole, CE는 670.00 μmole로 뚜렷한 차이를 보이

Table 3. Released free fatty acids (FFA) according to aging time from pH-stat digestion model (type Ⅱ)[1)]

Day	Consumed NaOH (mL)		Released FFA (μmol)	
	Control	CE[2)]	Control	CE
0	13.22±0.58	13.41±0.10	661.13±28.81	670.00±4.77
2	13.31±0.14	12.85±0.15	665.38±6.89	642.50±7.42
4	12.81±0.37	12.11±0.43	640.25±18.74	605.63±21.39
7	12.74±0.75	12.02±0.26	637.00±37.48	601.00±13.08
18	12.52±1.21	11.46±0.12	625.88±60.63	572.88±6.19
43	12.62±0.49	10.64±0.11	631.00±24.75	532.13±5.48

[1)]All data are shown as mean±standard deviation (n=2).
[2)]CE: cacao extract was added.

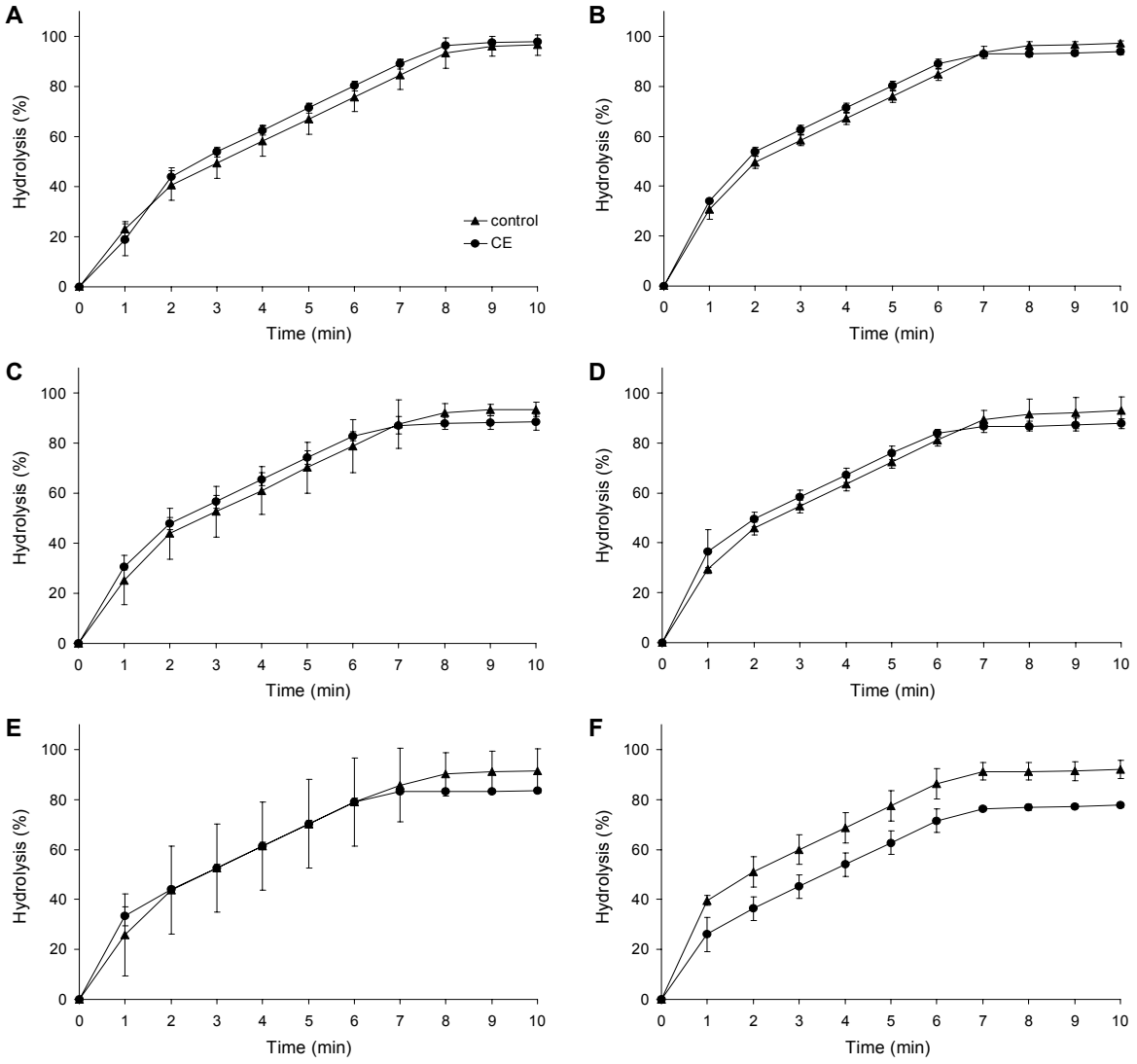

Fig. 5. Comparison of hydrolysis rate (%) of cacao powder extract-added (CE) O/W emulsion and control according to different aging time from pH-stat digestion model (type Ⅱ). Aging time: (A) 0 day, (B) 2 day, (C) 4 day, (D) 7 day, (E) 18 day, (F) 43 day.

Table 4. Parameters according to aging time from pH-stat digestion model (type Ⅱ)[1)]

Day	d_0 (μm)		k value[2)] (μmol/s/m^2)		$t_{1/2}$[3)] (min)		Φ max[4)] (%)	
	Control	CE	Control	CE	Control	CE	Control	CE
0	0.57±0.00	0.42±0.00	0.92±0.17	0.96±0.03	2.95±0.69	2.76±0.11	96.53±4.21	97.91±0.69
2	0.55±0.04	0.44±0.02	0.96±0.04	0.81±0.03	2.76±0.16	3.28±0.22	97.15±1.01	93.81±1.08
4	0.53±0.04	0.42±0.04	0.81±0.04	0.65±0.03	3.28±0.22	4.06±0.34	93.48±2.74	88.42±3.13
7	0.57±0.01	0.45±0.01	0.81±0.13	0.65±0.03	3.34±0.68	4.06±0.34	93.00±5.47	87.75±1.94
18	0.62±0.00	0.47±0.04	0.77±0.18	0.58±0.04	3.58±1.01	4.61±0.43	91.38±8.85	83.64±0.91
43	0.58±0.05	0.38±0.01	0.73±0.04	0.50±0.03	3.63±0.27	5.32±0.58	92.13±3.61	77.69±0.81

[1)]All data are shown as mean±standard deviation (n=2).

[2)]k value (μmole/s/m^2)= $\frac{a \times d_0 \times \rho}{Mw} \times 100$

[3)]$t_{1/2}= \frac{\rho \times d_0}{k \times Mw}\left(1 - \frac{1}{\sqrt[3]{2}}\right)$

[4)]Φ max (%)= $\frac{V_{NaOH}\ (10\ min) \times M_{NaOH}}{Oil\ weight/Mw \times 2 \times 10^3} \times 100$

[1)-4)]Equations were from reference 14.

지 않았고, aging time이 길어질수록 control과 CE-emulsion에서 가수분해된 FFA의 양은 감소하는 경향을 보였다. 그러나 control의 aging time에 따른 FFA의 양의 변화보다는 CE-emulsion의 경우에서 더 큰 차이를 보였다. 특히 43일에는 control이 631.00 μmole, CE-emulsion이 532.13 μmole로 CE-emulsion에서 가수분해된 FFA의 양이 적었다. 이와 같은 결과는 반응의 최대 가수분해율을 나타낸 Φ max의 결과와 유사한 경향을 보였다. Aging time이 길어질수록 CE-emulsion의 Φ max가 control보다 더 많이 감소하여 43일에는 control이 92.13%, CE-emulsion이 77.69%로 나타나 control보다 CE-emulsion의 가수분해가 저해되었다. 한편 CE-emulsion에서 aging time이 길어짐에 따라 지방구의 크기(d_0, Table 4)가 커지지 않았기 때문에 Φ max 및 가수분해되는 FFA의 양이 감소하는 것은 유화액의 안정도에 의한 결과와는 연관성이 크지 않다고 판단된다.

반응 전체의 속도를 나타내는 k value(μmole/s/m^2)는 emulsion의 지방구 크기, 밀도와 같은 물리적인 요소를 고려하여 얻어진 속도 상수이다(14). Aging time에 따른 k value 변화는 control과 CE-emulsion 모두 감소하는 경향을 보였는데, 43일에는 control이 0.73 μmole/s/m^2, CE-emulsion이 0.50 μmole/s/m^2로 CE-emulsion의 가수분해 속도가 더 낮아 control보다 가수분해가 저해된 것으로 생각된다. 최대 가수분해 반응의 50%가 일어나는 시간($t_{1/2}$,분)의 경우에는 aging time이 길어질수록 CE-emulsion의 $t_{1/2}$이 control보다 더 길어져 43일에는 control이 3.63분인 반면, CE-emulsion은 5.32분으로 반응의 50%가 일어나는 데 카카오 추출물을 첨가한 유화액에 더 긴 시간이 소요되었다.

요 약

페놀화합물의 함량이 높다고 알려진 카카오(powder)로부터 카카오 추출물(CE)을 획득한 후, CE가 pancreatic lipase의 활성에 미치는 영향과 CE를 함유한 emulsion의 aging에 의한 가수분해율 변화를 살펴보기 위하여 두 가지 형태의 기질을 사용한 pH-stat digestion model을 이용하였다. Type Ⅰ의 경우 소화액에 CE와 콩기름을 첨가하여 emulsion을 제조하였으며 aging time(0, 5, 24시간)에 따른 가수분해 변화를 살펴보았다. CE를 첨가하였을 때의 가수분해율은 CE를 첨가하지 않았을 때와 큰 차이를 보이지 않아 CE가 pancreatic lipase 활성에 영향을 주지 않았다고 판단된다. 그러나 aging time이 지남에 따라 CE를 첨가하였을 때와 CE를 첨가하지 않았을 때의 가수분해율 모두 감소하였다. 이는 CE의 영향보다는 aging time이 길어짐에 따라 emulsion의 안정도가 낮아져 지방구 크기가 증가하여 가수분해율이 모두 감소한 것으로 생각되고, 따라서 이 모델에서는 CE에 의한 가수분해 저하가 크지 않았다. 한편 type Ⅱ의 경우 먼저 콩기름과 CE, Tween 20를 혼합하고 고압균질기를 사용하여 micro-emulsion을 제조한 후, 이를 기질로 하여 aging time(0, 2, 4, 7, 18, 43일)에 따른 가수분해율 변화를 살펴보았다. 그 결과 aging time에 따라 CE를 첨가하지 않은 control과 CE를 첨가한 CE-emulsion의 가수분해율이 감소하였는데, 특히 control보다 CE-emulsion이 더 많이 감소하여 43일에는 control의 Φ max가 92.13%(0일, 96.53%)였으나 CE-emulsion은 77.69%(0일, 97.91%)를 보이면서 CE-emulsion의 가수분해 반응이 control에 비해 낮았다. 다른 kinetic parameter(k value, $t_{1/2}$ 등)에서도 이와 유사한 경향을 나타냈다.

REFERENCES

1. Lee YS, Cho Y, Shin MJ. 2015. Dietary very long chain saturated fatty acids and metabolic factors: findings from the Korea National Health and Nutrition Examination survey 2013. *Clin Nutr Res* 4: 182-189.
2. Himes CL. 2013. Obesity, disease, and functional limitation in later life. *Demography* 37: 73-82.
3. Nakai M, Fukui Y, Asami S, Toyoda-Ono Y, Iwashita T, Shibata H, Mitsunaga T, Hashimoto F, Kiso Y. 2005. Inhibitory effects of oolong tea polyphenols on pancreatic lipase in vitro. *J Agric Food Chem* 53: 4593-4598.
4. Birari RB, Bhutani KK. 2007. Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential. *Drug Discov Today* 12: 879-889.
5. Tzoumaki MV, Moschakis T, Scholten E, Biliaderis CG. 2013. *In vitro* lipid digestion of chitin nanocrystal stabilized o/w emulsions. *Food Funct* 4: 121-129.
6. Armand M, Pasquier B, André M, Borel P, Senft M, Peyrot J, Salducci J, Portugal H, Jaussan V, Lairon D. 1999. Digestion and absorption of 2 fat emulsions with different droplet sizes in the human digestive tract. *Am J Clin Nutr* 70: 1096-1106.
7. Almoosawi S, McDougall GJ, Fyfe L, Al-Dujaili EAS. 2010. Investigating the inhibitory activity of green coffee and cacao bean extracts on pancreatic lipase. *Nutr Bull* 35: 207-212.
8. McDougall GJ, Kulkarni NN, Stewart D. 2009. Berry polyphenols inhibit pancreatic lipase activity *in vitro*. *Food Chem* 115: 193-199.
9. Jalil AM, Ismail A. 2008. Polyphenols in cocoa and cocoa products: is there a link between antioxidant properties and health?. *Molecules* 13: 2190-2219.
10. Gu Y, Hurst WJ, Stuart DA, Lambert JD. 2011. Inhibition of key digestive enzymes by cocoa extracts and procyanidins. *J Agric Food Chem* 59: 5305-5311.
11. Thompson RS, Jacques D, Haslam E, Tanner RJN. 1972. Plant proanthocyanidins. Part Ⅰ. Introduction; the isolation, structure, and distribution in nature of plant procyanidins. *J Chem Soc Perkin Trans* 1: 1387-1399.
12. Natsume M, Osakabe N, Yamagishi M, Takizawa T, Nakamura T, Miyatake H, Hatano T, Yoshida T. 2000. Analyses of polyphenols in cacao liquor, cocoa, and chocolate by normal-phase and reversed-phase HPLC. *Biosci Biotechnol Biochem* 64: 2581-2587.
13. Versantvoort CHM, Oomen AG, Van de Kamp E, Rompelberg CJM, Slips AJAM. 2005. Applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. *Food Chem Toxicol* 43: 31-40.
14. Li Y, McClements DJ. 2010. New mathematical model for interpreting pH-stat digestion profiles: impact of lipid drop-

let characteristics on in vitro digestibility. *J Agric Food Chem* 58: 8085-8092.
15. Wollgast J. 2004. The contents and effects of polyphenols in chocolate: qualitative and quantitative analyses of polyphenols in chocolate and chocolate raw products as well as evaluation of potential implications of chocolate consumption in human health. *PhD Dissertation*. University of Giessen, Giessen, Germany.
16. Reddy SR, Fogler HS. 1980. Emulsion stability: determination from turbidity. *J Colloid Interface Sci* 79: 101-104.
17. Ivanov IB, Danov KD, Kralchevsky PA. 1999. Flocculation and coalescence of micron-size emulsion droplets. *Colloids Surf A* 152: 161-182.