

바나나 껍질과 파인애플 껍질 Ester Synthetase를 이용한 Ethyl Butyrate의 효소적 합성

윤기홍¹ · 김기혁^{2,3} · 이규희³

¹우송대학교 외식조리영양학부

²우송대학교 외식조리학부

³우송대학교 조리과학연구센터

Enzymatic Synthesis of Ethyl Butyrate Using Ester Synthetase Derived from Banana Peel and Pineapple Peel

Ki-Hong Yoon¹, Kee-huck Kim^{2,3}, and Gyu-Hee Lee³

¹Department of Food Science & Biotechnology, ²Department of Culinary Arts, and

³Culinary Science Research Center, Woosong University

ABSTRACT Currently, the consumer trends are increasing towards “natural” in all food systems. Therefore, in the flavor industry, the production of flavor esters by “natural” methods are needed. On the other hand, “natural flavor” is expensive to produce because of the limited natural source. Recently, the flavor obtained from the enzyme or microbial could be represented as “natural flavor”. Ethyl butyrate is used most frequently as a fruity aroma in drinks and the processed food industry. In this study, ethyl butyrate was synthesized enzymatically using the ester synthetase obtained from the waste of pineapple and banana peel. The ethyl butyrate production optimization was analyzed using a response surface methodology. The enzyme reaction variances were composed of the ethanol content, butyric acid content, and reaction time. As a result, in ester synthetase obtained from banana peel, the maximum predicted production amounts were 45.8199 mM at an ethanol content of 38.7050 mM, butyric acid content of 50.9019 mM, and reaction time of 4.3662 h. In ester synthetase obtained from pineapple peel, the maximum predicted production was 65.1087 mM at an ethanol content of 54.6502 mM, butyric acid content of 58.7638 mM, and reaction time of 4.7436 h. In conclusion, ethyl butyrate production was shown the more useful using the ester synthetase obtained from pineapple peel than that from banana peel.

Key words: natural, flavor, ester synthetase, ethyl butyrate

서 론

향기 성분은 향장산업과 제약산업에서 뿐만 아니라 식품 산업에서도 식품첨가물의 1/4을 차지할 만큼 널리 사용되고 있다(1). 식품에 사용되는 향기 성분은 과일 및 허브 등 천연 원료에서 추출하거나 화학적으로 합성한 것을 주로 사용한다. 천연원료에서 추출한 향기 성분은 “natural”이라는 장점이 있지만 천연원료 및 추출과정에 비용이 많이 든다는 단점이 있다. 화학적으로 합성한 향기 성분은 생산 비용을 감소시킬 수는 있지만 “natural”이라는 표현을 할 수 없다는 단점이 있다(2,3). 효소를 이용하여 합성된 향기 성분은 “natural”이라는 표현을 쓸 수 있으며 천연원료에서 추출한 향기 성분보다 비용이 적게 소요된다는 장점을 가질 수 있다(1,2).

특히 ester 향은 식품에서 바람직한 과일 향의 기본 향으로 자주 사용되고 있으며 이들 중 ethyl ester는 음료나 가공 식품의 과일 향으로 주로 사용되고 있다(4). Ethyl ester 중 ethyl butyrate는 식품 향으로 자주 다량 사용되고 있으며 그 사용량이 증가하고 있다. 따라서 ethyl butyrate는 ethanol과 butyric acid를 강한 산화제 존재 하에서 유기적으로 합성한 것을 사용해왔다. 그러나 오늘날 경제력이 향상되고 건강을 매우 중요시하기 때문에 인공재료가 아닌 천연재료, 유기농 식품 및 기능성 식품에 관심이 증가함에 따라 소비자들은 food system에서 “natural”을 선호하는 경향을 나타내고 있다. 식품 향에 있어서 효소적 또는 미생물학적 방법에 의해 얻어진 향기 성분은 “natural”이란 표현을 쓸 수 있다(5). 그래서 최근 미생물과 동물에서 기인한 효소를 이용하여 천연향을 얻기 위한 다양한 방법들이 시도되었다(6). 몇몇 ester는 baker’s와 brewer’s yeast에서 유래한 esterase를 이용하여 생산하였고(7), Chowdary 등(8)은 treating 우유나 유제품에서 fruity flavor를 생산하였다. Ueda 등(9)은

Received 22 May 2017; Accepted 16 August 2017

Corresponding author: Gyu-Hee Lee, Department of Food Science & Biotechnology, Woosong University, Daejeon 34606, Korea
E-mail: gyuhee@wsu.ac.kr, Phone: +82-42-630-9744

바나나, 멜론, 딸기의 과육으로부터 alcohol acyl CoA transferase(ester synthetase)를 이용하여 ester 향 생성에 대하여 조사하였다.

본 연구는 소비자들의 “natural”을 선호하는 소비자 선호도를 만족시키기 위해 waste로 버려지는 바나나 껍질과 파인애플 껍질에서 ester synthetase를 추출하고 기질을 ethanol과 butyric acid로 농도, 시간, 온도 등을 변수로 한 반응 향의 생성가능성을 조사하여 ethyl butyrate의 효소적 생산에 대한 기초자료로 활용하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

바나나와 파인애플은 시장에서 구입하여 껍질 부분만 사용하였다. 기질로 사용한 analytical grade의 ethanol과 butyric acid는 Sigma-Aldrich Co.(Milwaukee, WI, USA)에서 제품을 구입하여 실험에 사용하였다.

조효소액의 준비

Ester synthetase는 Ueda 등(9)의 방법을 수정하여 추출하였다. 500 g의 바나나 껍질과 파인애플 껍질을 각각 으깨고 압착한 후 10,000 rpm에서 30분간 원심분리 한 다음 상등액을 취하였다. 취해진 상등액을 투석막 안에 넣은 후 80% ammonium sulfate 염 용액을 가하여 침전시켰다. 얻어진 침전물은 5 mM potassium phosphate buffer로 투석한 후 투석막 안에 있는 용액을 10,000 rpm에서 30분간 원심분리 한 액을 조효소액으로 하였다.

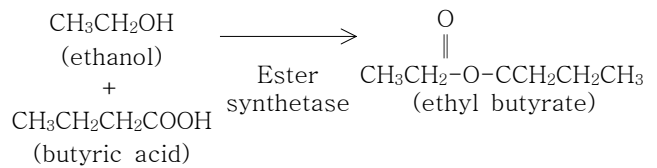
Ethyl butyrate 합성 반응표면분석 design

효소 반응에서 기질의 양과 반응시간은 매우 중요한 요인 변수이다. 본 연구에서는 바나나 껍질과 파인애플 껍질에서 식품의 향에 가장 많이 사용되는 ethyl butyrate를 합성할 수 있는 ester synthetase의 최적 조건을 확립하고자 반응 표면분석(response surface methodology, RSM) 중심합성 계획법을 적용하였다. Ester synthetase를 이용하여 ethyl butyrate를 합성하기 위해서 ethanol 함량(10~50 mM), butyric acid 함량(10~50 mM) 그리고 반응시간(0~5 h)을 -1.682, -1, 0, 1, 1.682 등을 독립변수로 부호화하여 20실험구로 구분하였으며 RSM design은 Table 1에 표시하였다. 기질로 사용된 ethanol과 butyric acid는 RSM design에 따라 0.1 M phosphate buffer solution(pH 6)에 혼합하였다. RSM design에 의해 준비된 기질에 효소 반응액을 첨

가하여 RSM design에 따라 반응시킨 후 trichloroacetic acid(TCA)를 이용하여 반응을 중지시켰다(9).

Ethyl butyrate 합성 활성 측정

Ethyl butyrate 합성 활성은 ethanol과 butyric acid를 기질로 하여 ester synthetase를 반응시켜 얻어진 ethyl butyrate의 생성량을 측정하였다. Ethanol과 butyric acid의 효소 반응에 의한 ethyl butyrate 생성반응식은 다음과 같다.



효소반응 후 생성된 ethyl butyrate는 solid phase microextraction fiber[Supelco SPME fiber holder(manual), 65 μm polydimethylsiloxane-divinylbenzene coated fiber, Supelco, Bellefonte, PA, USA]에 흡착시킨 후 GC-injection port에서 탈착하는 방법을 활용하였다. Gas chromatography(6000D, Young-Lin Co., Ltd., Anyang, Korea) 운영 조건으로 injector 온도는 220°C, oven 온도는 초기 3분 동안은 40°C로 유지하고 ramp rate를 6°C로 하여 최종 온도가 200°C 될 때까지 승온하였고, 200°C에서 20분간 유지하면서 ethyl butyrate 함량을 분석하였다. Ethyl butyrate의 정성은 표준품과 retention time이 같은 것을 같은 물질로 보았으며, 정량은 표준품의 농도에 따른 면적을 이용하여 표준곡선을 작성하여 정량하였다(10). 생성된 ethyl butyrate 함량(mM)을 최종 결과물로 하였다.

통계분석

RSM 분석은 Minitab 프로그램(ver 14, Minitab Inc., State College, PA, USA) 중심합성법을 이용하여 최적화 조건을 도출하였고, 도출된 조건에 따른 실험을 실시하여 얻어진 결과로 반응표면분석을 실시하였다.

결과 및 고찰

바나나 껍질 ester synthetase에 의한 ethyl butyrate의 합성에서 RSM 분석

반응표면분석 결과는 ethyl butyrate 생성량으로 확인하였다. RSM design을 이용하여 바나나 껍질에서 추출한 es-

Table 1. Levels of independent variables for experimental design

xi	Independent variables	Levels				
		-1.682	-1	0	1	1.682
x1	Ethanol conc. (mM)	10	20	30	40	50
x2	Butyric acid conc. (mM)	10	20	30	40	50
x3	Reaction time (h)	1	2	3	4	5

ter synthetase를 반응시켜 생성된 ethyl butyrate 생성량은 Table 2에 나타내었다.

바나나 껍질에서 추출한 ester synthetase를 반응시켜 생성된 ethyl butyrate 생성량에 대한 반응표면분석 타당성 검증 결과는 Table 3에 나타내었다. 결과에서 R^2 은 0.8617 ($P=0.0028$)로 $P<0.05$ 로 유의성이 인정되어 반응표면분석이 타당함을 알 수 있었다. 반응모델에 대한 분산분석 결과는 Table 4에 나타내었으며, 결과에서 선형효과(linear)는

$P=0.0003$ 으로 $P<0.05$ 이므로 유의함을 알 수 있었으나, 2차 효과(quadratic)는 $P=0.1788$, 교차곱 효과(cross product)는 $P=0.1621$ 로 $P>0.05$ 이므로 유의함이 없는 것을 알 수 있었다. 그러나 total model은 $P=0.0028$ 로 $P<0.05$ 이므로 반응모델이 통계적으로 유의함을 알 수 있었다(11). 지정된 반응모델에 대한 적합 결여 검증(lack of fit)을 실시한 결과(Table 4) 유의확률이 0.000으로 $P<0.05$ 이므로 가정된 모델이 자료에 적절히 적합하지 못했음을 알 수 있었다.

Table 2. Amount of ethyl butyrate by using ester synthetase derived from banana and pineapple peel

Run number	Process variable			Amount of ethyl butyrate (mM)	
	Ethanol conc. (mM)	Butyric acid conc. (mM)	Reaction time (h)	Banana peel ester synthetase	Pineapple peel ester synthetase
1	30 (0)	30 (0)	3 (0)	41.0	48.1
2	20 (-1)	40 (1)	2 (-1)	33.8	31.3
3	30 (0)	30 (0)	5 (1.682)	42.1	51.3
4	40 (1)	40 (1)	2 (-1)	30.8	43.8
5	30 (0)	50 (1.682)	3 (0)	47.6	56.3
6	30 (0)	30 (0)	3 (0)	39.8	49.1
7	40 (1)	40 (1)	4 (1)	42.3	54.3
8	30 (0)	30 (0)	1 (-1.682)	21.3	27.2
9	40 (1)	20 (-1)	2 (-1)	41.0	44.3
10	50 (1.682)	30 (0)	3 (0)	53.0	63.4
11	30 (0)	10 (-1.682)	3 (0)	32.9	43.2
12	10 (-1.682)	30 (0)	3 (0)	25.8	26.1
13	30 (0)	30 (0)	3 (0)	39.0	49.7
14	10 (-1)	20 (-1)	4 (1)	34.2	32.2
15	30 (0)	30 (0)	3 (0)	39.5	49.2
16	10 (-1)	20 (-1)	2 (-1)	22.5	23.3
17	10 (-1)	40 (1)	4 (1)	43.3	46.2
18	40 (1)	20 (-1)	4 (1)	51.5	61.5
19	30 (0)	30 (0)	3 (0)	39.2	50.4
20	30 (0)	30 (0)	3 (0)	39.8	49.5

Table 3. Predicted levels of optimum preparation conditions for the maximized yields of the ethyl butyrate by the ridge analysis and superimposing of their response surfaces by ester synthetase derived from banana peel and pineapple peel

Preparation conditions	Levels for the maximum response surfaces		Significance	
	Banana peel	Pineapple peel	Banana peel	Pineapple peel
Concentration of ethanol (mM)	38.7050	54.6502	0.0049	0.0003
Concentration of butyric acid (mM)	50.9019	58.7638	0.1507	0.0429
Reaction time (h)	4.3662	4.7436	0.0067	0.0032
R^2	0.8617	0.9313	0.0028	0.0005
Morphology	Saddle point	Saddle point	—	—
Predicted value (mM)	45.8199	65.1087	—	—

Table 4. Analysis of variance for the fit of experimental data to response surface model (RSM)

Regression	Degree of freedom	Sum of square		Significance	
		Banana peel	Pineapple peel	Banana peel	Pineapple peel
Linear	3	947.6634	2,087.6822	0.0003	<0.0001
Quadratic	3	113.4677	165.5785	0.1788	0.0691
Cross product	3	120.1815	59.0785	0.1621	0.3746
Total model	9	1,181.3127	2,312.3392	0.0028	0.0001
Lack of fit	5	187.10	167.72	0.000	0.000
Pure error	5	2.49	2.89		
Total error	19	1,370.91	2,482.96		

Table 5. Polynomial equation calculated by RSM program for making ethyl butyrate by using ester synthetase derived from banana and pineapple peel

Response	Polynomial equations
Ethyl butyrate yield from banana peel	$y = -26.2802 + 0.7972 \times x_1 + 0.8221 \times x_2 + 16.3739 \times x_3 + 0.0076 \times x_1^2 - 0.0279 \times x_2 \times x_1 + 0.0036 \times x_2^2 + 0.0072 \times x_3 \times x_1 - 0.0024 \times x_3 \times x_2 - 1.7641 \times x_3^2$
Ethyl butyrate yield from pineapple peel	$y = -30.6736 + 1.4831 \times x_1 + 0.3340 \times x_2 + 19.1578 \times x_3 - 0.0033 \times x_1^2 - 0.0178 \times x_2 \times x_1 + 0.0025 \times x_2^2 - 0.0141 \times x_3 \times x_1 + 0.0712 \times x_3 \times x_2 - 2.3793 \times x_3^2$

x1: ethanol conc., x2: butyric acid conc., x3: reaction time.

그러나 반응모델에 대한 유의확률에서 유의성이 인정되므로 가정된 회귀모형이 최상은 아니지만 자료 적합이 가능함을 알 수 있었다(12).

바나나 껍질에서 추출한 ester synthetase 생성량에 대한 반응모형공식은 Table 5에 나타내었다. 반응표면 모형공식은 독립변수와 ethyl butyrate 생성량과의 경험적인 관계를 설명하는 것으로(13) 반응모형공식에서 각 요인에 대한 계수가 높은 것은 반응에 영향력이 큰 요인으로 간주할 수 있다(14). Table 5 결과에서 바나나 껍질에서 추출한 ester synthetase를 반응시켜 생성된 ethyl butyrate 생성은 반응시간(x3)이 계수가 16.3739로 가장 크게 영향을 미치는 것을 알 수 있었고, ethanol 농도(x1)와 butyric acid 농도(x2)의 영향력은 유사한 것을 알 수 있었다. 다중곡선구조를 기반으로 형성된 삼차원 반응표면에 대한 그림은 Fig. 1에 나타내었다. Fig. 1A는 반응시간 3시간이 되었을 때 ethanol 농도(x1)와 butyric acid 농도(x2) 사이의 상호작용을 나타낸 것으로 ethanol 농도가 증가함에 따라 ethyl butyrate 생성량은 증가하는 것을 알 수 있었으나, butyric acid 농도가 높아질수록 ethyl butyrate 생성량은 조금씩 줄어드는

경향을 나타내었다. Fig. 1B는 butyric acid가 30 mM일 때 ethanol 농도(x1)와 반응시간(x3) 사이의 상호작용을 나타낸 것으로 ethanol 농도가 증가함에 따라 ethyl butyrate 생성량은 증가하는 것을 알 수 있었다. 반응시간이 4시간이 지날 때까지 ethyl butyrate 함량은 증가하였으나 그 이후에는 유지하는 경향을 나타내었다. Fig. 1C는 ethanol 농도가 30 mM일 때 butyric acid 농도(x2)와 반응시간(x3) 사이의 상호작용을 나타낸 것으로 butyric acid 농도가 증가함에 따라 ethyl butyrate 생성량은 증가하는 것을 알 수 있었다. Ethyl butyrate도 반응시간이 4시간이 지날 때까지 ethyl butyrate 함량은 증가하였으나 그 이후에는 유지하는 경향을 나타내었다.

정준분석 결과에서 원래 x 좌표축과 정준형식에서 사용되는 새로운 w 좌표축 간의 관계를 나타내는 고유벡터(eigenvalues)를 고려한 정준형식은 $y = 45.8199 + 7.9213w_1 - 3.3735w_2 - 7.0897w_3$ 임을 알 수 있었다. 정준형식에서 양수와 음수가 혼합되어 있어 정상점은 안장점이 되므로 능선분석을 행하였다(15). 능선분석을 통해 바나나 껍질 ester synthetase를 이용한 ethyl butyrate 생성 최대값을 찾

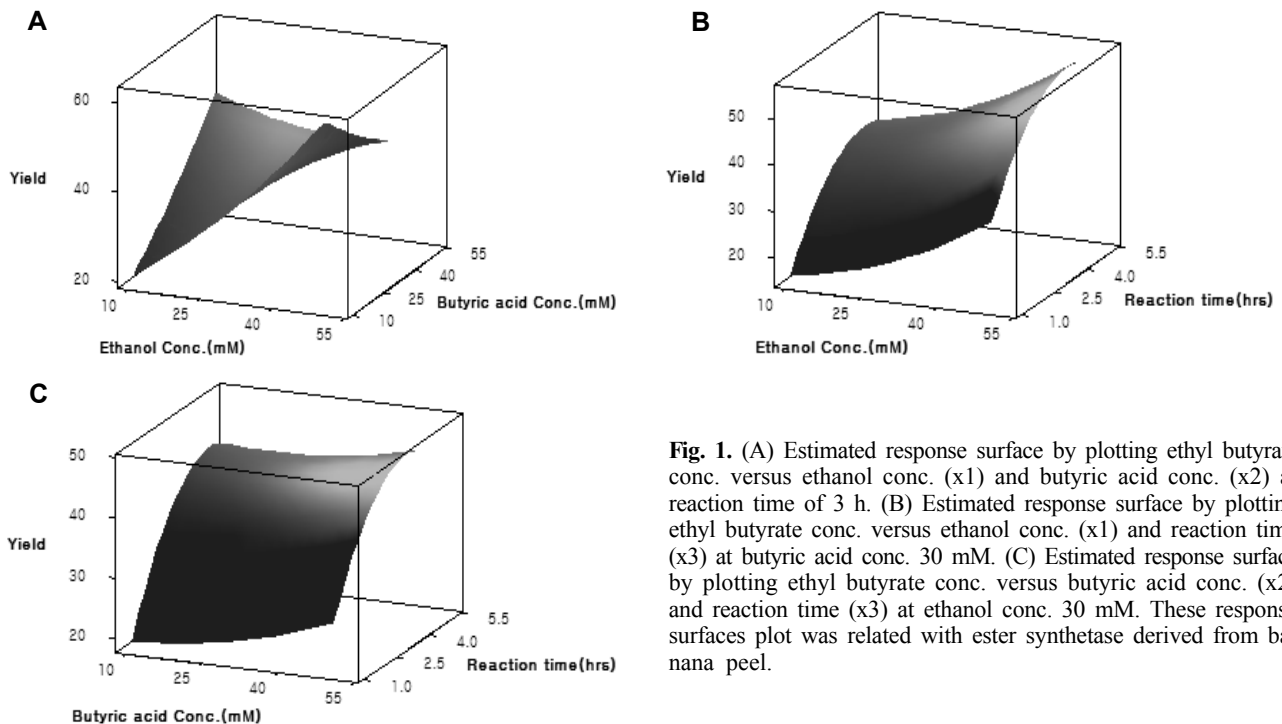


Fig. 1. (A) Estimated response surface by plotting ethyl butyrate conc. versus ethanol conc. (x1) and butyric acid conc. (x2) at reaction time of 3 h. (B) Estimated response surface by plotting ethyl butyrate conc. versus ethanol conc. (x1) and reaction time (x3) at butyric acid conc. 30 mM. (C) Estimated response surface by plotting ethyl butyrate conc. versus butyric acid conc. (x2) and reaction time (x3) at ethanol conc. 30 mM. These response surfaces plot was related with ester synthetase derived from banana peel.

있을 때 ethanol의 농도는 38.7050 mM, butyric acid의 농도는 50.9019 mM, 반응시간은 4.3662시간일 때 최대 생성 예측값은 45.8199 mM임을 알 수 있었다(Table 3).

파인애플 껍질 ester synthetase에 의한 ethyl butyrate의 합성

RSM design을 이용하여 파인애플 껍질에서 추출한 ester synthetase를 반응시켜 생성된 ethyl butyrate 생성량은 Table 2에 나타내었다.

파인애플 껍질에서 추출한 ester synthetase를 반응시켜 생성된 ethyl butyrate 생성량에 대한 반응표면분석 타당성 검증 결과는 Table 3에 나타내었으며, 결과에서 R^2 은 0.9313 ($P=0.0005$)으로 $P<0.05$ 수준에서 유의성이 인정되어 반응표면분석이 타당함을 알 수 있었다.

Table 4 반응모델에 대한 분산분석결과 선형효과(linear)는 $P<0.0001$ 로 $P<0.05$ 이므로 유의함을 알 수 있었으나, 2차 효과(quadratic)는 $P=0.0691$ 과 교차곱 효과(cross product)는 $P=0.3746$ 으로 $P>0.05$ 이므로 유의성이 없는 것을 알 수 있었다. 그러나 total model은 $P=0.0001$ 로 $P<0.05$ 이므로 반응모형이 통계적으로 유의함을 알 수 있었다(11). 지정된 반응모형에 대한 적합 결여 검정을 실시한 결과(Table 4) 유의확률이 0.000으로 $P<0.05$ 이므로 가정된 모형이 자료에 적절히 적합하지 못하였으나 model에 대한 유의확률에서 유의성이 인정되어 가정된 회귀모형이 최상은 아니지만 자료 적합이 가능함을 알 수 있었다(12).

파인애플 껍질에서 추출한 ester synthetase 생성량에 대한 반응모형공식은 Table 5에 나타내었다. 반응모형공식에서 각 요인에 대한 계수가 높은 것은 반응에 영향력이 큰

요인으로 간주할 수 있다(14). Table 5 결과에서 파인애플 껍질에서 추출한 ester synthetase를 반응시켜 생성된 ethyl butyrate 생성은 반응시간(x_3)이 계수가 19.1578로 가장 크게 영향을 미치는 것을 알 수 있었고, butyric acid 농도(x_1)보다 ethanol 농도(x_2)가 영향을 더 미치는 것을 알 수 있었다. 다중곡선구조를 기반으로 형성된 삼차원 반응표면에 대한 그림은 Fig. 2에 나타내었다. Fig. 2A는 반응시간 3시간이 되었을 때 ethanol 농도(x_1)와 butyric acid 농도(x_2) 사이의 상호작용을 나타낸 것으로 ethanol 농도가 증가함에 따라 ethyl butyrate 생성량은 증가하는 것을 알 수 있었고, butyric acid 농도가 10 mM일 때 ethyl butyrate 생성량은 가장 높은 생성량을 나타내었으나 25 mM 이상에서는 ethyl butyrate 생성량이 유지됨을 알 수 있었다. Fig. 2B는 butyric acid가 30 mM일 때 ethanol 농도(x_1)와 반응시간(x_3) 사이의 상호작용을 나타낸 것으로 ethanol 농도가 증가함에 따라 ethyl butyrate 생성량은 증가하는 것을 알 수 있었다. 반응시간이 4시간 지날 때까지 ethyl butyrate 함량은 급격히 증가하였으나 그 이후에는 증가량이 크지 않은 것을 알 수 있었다. Fig. 2C는 ethanol 농도가 30 mM일 때 butyric acid 농도(x_2)와 반응시간(x_3) 사이의 상호작용을 나타낸 것으로, butyric acid 농도가 증가함에 따른 ethyl butyrate의 생성량은 40 mM이 될 때까지 거의 변화가 없다가 그 이상의 농도에서는 서서히 증가하는 것을 알 수 있었다. 반응시간이 4.5시간이 지날 때까지 ethyl butyrate 함량은 급격히 증가하였으나 그 이후에는 서서히 증가하는 경향을 나타내었다.

정준분석 결과에서 eigenvalues를 고려한 정준형식은 $y=65.1087+3.7393w_1-3.8562w_2-9.7114w_3$ 으로 ei-

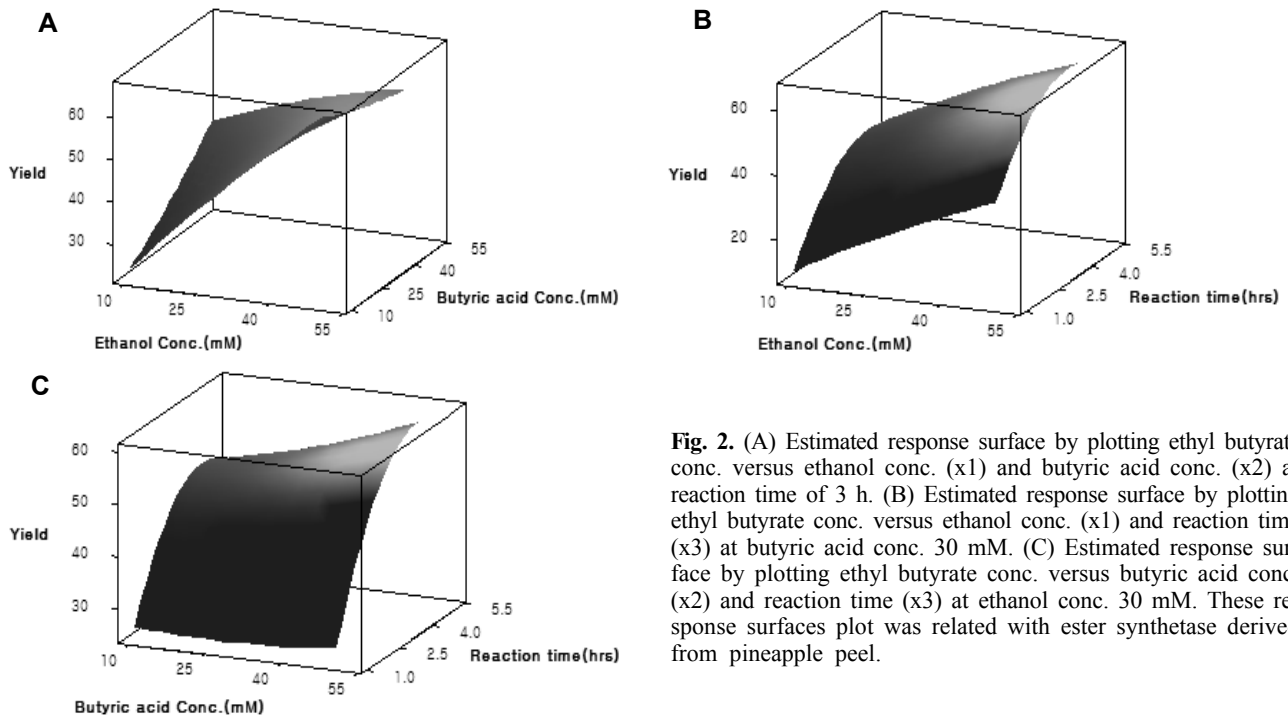


Fig. 2. (A) Estimated response surface by plotting ethyl butyrate conc. versus ethanol conc. (x_1) and butyric acid conc. (x_2) at reaction time of 3 h. (B) Estimated response surface by plotting ethyl butyrate conc. versus ethanol conc. (x_1) and reaction time (x_3) at butyric acid conc. 30 mM. (C) Estimated response surface by plotting ethyl butyrate conc. versus butyric acid conc. (x_2) and reaction time (x_3) at ethanol conc. 30 mM. These response surfaces plot was related with ester synthetase derived from pineapple peel.

genvalues는 양수와 음수가 혼합되어 있어 정상점은 안장점이 되므로 능선분석(ridge analysis)을 행하였다(15). 능선분석을 통해 파인애플 껍질 ester synthetase를 이용한 ethyl butyrate 생성 최대값을 찾았을 때 ethanol의 농도는 54.6502 mM, butyric acid의 농도는 58.7638 mM, 반응시간은 4.7436시간일 때 최대 예측값은 65.1087 mM임을 알 수 있었다(Table 3).

바나나 껍질과 파인애플 껍질 ester synthetase에서 ethyl butyrate 생성의 특성 비교

Ethyl butyrate 효소적 합성을 하기 위하여 생성량을 중심으로 분석하였을 때 Table 4 반응모형곡선에서 두 효소 모두 반응시간에 영향을 많이 받는 것을 알 수 있었다. 기질 농도에서는 바나나 껍질에서 회수한 ester synthetase는 ethanol 농도나 butyric acid 농도보다는 시간에 영향을 받는 것을 알 수 있었다. 파인애플 껍질에서 회수한 ester synthetase는 ethanol 농도가 butyric acid보다 더 영향을 미치는 것을 알 수 있었다. Table 3에서 바나나 껍질을 이용하여 반응시켰을 때 45.8199 mM보다는 파인애플 껍질을 이용하여 효소 반응시켰을 때 반응표면분석 결과 예측되는 생성량이 65.1087 mM로 더 많은 양을 생성할 수 있음을 알 수 있었다. 최대 생성량 예측값을 얻기 위해 효소의 반응시간은 파인애플 껍질에서 회수한 ester synthetase가 4.7436시간으로 바나나 껍질에서 회수한 ester synthetase 반응시간 4.3662보다 더 길어지는 것을 알 수 있었다. 결과를 종합해볼 때 바나나에서 회수한 ester synthetase와 파인애플 껍질에서 회수한 ester synthetase의 특징은 다른 것으로 판단되며, 시간은 조금 더 걸리지만 ethyl butyrate 합성을 위해서는 바나나 껍질에서 회수한 ester synthetase보다는 파인애플 껍질에서 회수한 ester synthetase가 더 효율이 높음을 알 수 있었다.

요 약

바나나 껍질과 파인애플 껍질에서 식품의 향에 가장 많이 사용되는 ethyl butyrate를 합성할 수 있는 ester synthetase의 최적 조건을 확립하고자 반응표면분석(response surface methodology, RSM)을 사용하였다. RSM 분석 결과 바나나 껍질에서 회수한 ester synthetase의 ethyl butyrate 합성 최적 조건은 ethanol의 농도가 38.7050 mM, butyric acid의 농도가 50.9019 mM, 반응시간이 4.3662시간일 때 최대 예측값은 45.8199 mM이었다. 파인애플 껍질에서 회수한 ester synthetase의 ethyl butyrate 합성 최적 조건은 ethanol의 농도가 54.6502 mM, butyric acid의 농도가 58.7638 mM, 반응시간이 4.7436시간일 때 최대 예측값은 65.1087 mM임을 알 수 있었다. 결론적으로 ethyl butyrate 합성을 위해서는 바나나 껍질에서 회수한 ester synthetase보다는 파인애플 껍질에서 회수한 ester syn-

thetase가 더 효율이 높음을 알 수 있었다. 앞으로 이들의 연속 대량 생산을 위해서 효소의 고정화 방법과 연속적인 기질 투입을 위한 기술 등의 개발이 더 이루어진다면 천연 향 원료의 개발이 가능할 것으로 판단된다.

REFERENCES

- Ahmed EH, Raghavendra T, Madamwar D. 2010. An alkaline lipase from organic solvent tolerant *Acinetobacter* sp. EH28: application for ethyl caprylate synthesis. *Bioresour Technol* 101: 3628-3634.
- Ozyilmaz G, Gezer E. 2010. Production of aroma esters by immobilized *Candida rugosa* and porcine pancreatic lipase into calcium alginate gel. *J Mol Catal B: Enzym* 64: 140-145.
- Abbas H, Comeau L. 2003. Aroma synthesis by immobilized lipase from *Mucor* sp.. *Enzyme Microb Technol* 32: 589-595.
- Wierschem M, Walz O, Mitsos A, Termuehlen M, Specht AL, Kissing K, Skiborowski M. 2017. Enzyme kinetics for the transesterification of ethyl butyrate with enzyme beads, coated packing and ultrasound assistance. *Chem Eng Process: Process Intensification* 111: 25-34.
- Longo MA, Sanromán MA. 2006. Production of food aroma compounds: microbial and enzymatic methodologies. *Food Technol Biotechnol* 44: 335-353.
- Serra S, Fuganti C, Brenna E. 2005. Biocatalytic preparation of natural flavours and fragrances. *Trends Biotechnol* 23: 193-198.
- Sun J, Lim Y, Liu SQ. 2013. Biosynthesis of flavor esters in coconut cream through coupling fermentation and lipase-catalyzed biocatalysis. *Eur J Lipid Sci Technol* 115: 1107-1114.
- Chowdary GV, Ramesh MN, Prapulla SG. 2000. Enzymic synthesis of isoamyl isovalerate using immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*: a multivariate analysis. *Process Biochem* 36: 331-339.
- Ueda Y, Tsuda A, Bai JH, Fujishita N, Chachin K. 1992. Characteristic pattern of aroma ester formation from banana, melon, and strawberry with reference to the substrate specificity of ester synthetase and alcohol contents in pulp. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 39: 183-187.
- Lee GH, Shin Y, Oh MJ. 2008. Aroma-active components of *Lycii fructus* (kukija). *J Food Sci* 73: C500-C505.
- Kuo CH, Peng LT, Kan SC, Liu YC, Shieh CJ. 2013. Lipase-immobilized biocatalytic membranes for biodiesel production. *Bioresour Technol* 145: 229-232.
- Cho YH, Shin DS, Park J. 2000. Optimization of emulsification and spray drying process for the microencapsulation of flavor compounds. *Korean J Food Sci Technol* 32: 132-139.
- Ye Q, Jin X, Zhu X, Lin T, Hao Z, Yang Q. 2015. An efficient extraction method for fragrant volatiles from *Jasminum sambac* (L.) Ait. *J Oleo Sci* 64: 645-652.
- Patel YL, Sher P, Pawar AP. 2006. The effect of drug concentration and curing time on processing and properties of calcium alginate beads containing metronidazole by response surface methodology. *AAPS Pharm Sci Tech* 7: E1-E7.
- Lee KD, Lee JE, Gwun JH. 2000. Application of response surface methodology in food industry. *Food Science and Industry* 33(1): 33-45.