

발간등록번호

11-1541000-001365-01

보안과제( ), 일반과제( O )

과제번호 109160-3

카놀라유로부터 친환경 효소적 공법을 이용한  
artificial cocoa butter 및 산업화가 가능한 공법의 개발

(Development of artificial cocoa butter for industrialization  
from canola oil by lipase-catalyzed esterification)

충남대학교

농림수산식품자료실



0007446

농림수산식품부

## 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “카놀라유로부터 친환경 효소적 공법을 이용한 artificial cocoa butter 및 산업화가 가능한 공법의 개발”에 관한 연구 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2012년 04월 09일

주관연구기관명 : 충남대학교

주관연구책임자 : 이 기 택

세부연구책임자 : 이 기 택

연 구 원 : 신 정 아

협동연구기관명 : 네오메가(주)

협동연구책임자 : 홍 장 환

연 구 원 : 김 홍 래

## 요 약 문

### I. 제 목

카놀라유로부터 친환경 효소적 공법을 이용한 artificial cocoa butter 및 산업화가 가능한 공법의 개발

### II. 연구개발의 목적 및 필요성

코코아버터(cocoa butter, CB)는 카카오(*Theobroma cacao*)의 과실 속 종자(카카오콩)에서 얻어지는 천연 유지로써 주로 palmitic acid(C16:0), stearic acid(C18:0) 그리고 oleic acid(C18:1)로 이루어져 있으며, 초콜릿류, 화장품류, 제과류 등에서 주원료로 사용되고 있는 고가의 유용자원이다. 기계적인 압착에 의해 얻어지는 코코아 버터는 20℃이하에서는 고체상태로 존재하다가, 20~30℃에서 녹기 시작하여 35℃이상에서는 급격히 용해되는 특성 때문에, 입안에서 부드럽게 녹는 느낌과 더불어 시원한 청량감을 주어 고가의 초콜릿 제조에 이용 되고 있다. 이러한 용해 특성은 코코아버터를 구성하고 있는 주요 triacylglycerol(TAG)이 1,3-dipalmitoyl-2-oleoyl glycerol(POP), 1(3)-palmitoyl-3(1)-stearoyl-2-oleoyl glycerol(POS), 1,3-distearoyl-2-oleoyl glycerol(SOS)와 같은 포화(Saturated)-불포화(Umsaturated)-포화(Saturated) 형태의 대칭형 TAG를 70%이상 함유하고 있기 때문이다. 이들 코코아버터는 초콜릿 및 관련 제과 공업의 원료에서 가장 비싼 원료 중의 하나이므로 경제적인 측면과 불안정한 원료의 공급을 대체하기 위하여 다양한 코코아버터 대체유지들이 개발되고 있는 실정이다.

카놀라유(canola oil)는 유채꽃에서 추출한 기름으로써 품종이 개량되어 식용으로 사용되며, oleic acid의 함량이 높기 때문에 코코아버터 대체지 합성에 적합한 유지이다. 따라서 본 과제에서는 카놀라유와 stearic ethylester(StEE)/palmitic ethylester(PEE)를 기질로하여 Lipozyme TLIM을 이용한 POS/SOS 합성을 위한 최적화 실험을 수행하였다. 국내 초콜릿시장 규모는 약 1천 2백억원 정도이며 코코아 함유 제품까지 포함하면 1천5백억 원대를 훨씬 웃도는 규모이다. 따라서 초콜릿 원료인 코코아버터 혹은 코코아버터 대체지의 수입을 대체할 수 있는 국내 artificial cocoa butter 생산 기술력이 요구된다. 또한, 유한한 코코아버터의 원료를 대체하기 위한 artificial cocoa butter의 제조는 국내 식품업체의 경쟁력 강화와 수출력 증대 등에 기여 할뿐만 아니라 유한한 원료의 사용증대에 따른 식품원료의 폭넓은 활용 및 원료 확보에 크게 기여할 것 이다.

따라서 본 연구과제의 최종 목표는 커져가는 초콜릿 시장에서 천연물인 코코아버터를 대체할 수 있는 artificial cocoa butter를 구성하는

POS (1-palmitoyl-2-oleoyl-3-stearoyl-sn-glycerol)와 SOS(1,3-distearoyl-2-oleoyl-sn-glycerol)을 친환경공법인 효소적 esterification 반응으로 카놀라유를 사용하여 artificial cocoa butter 합성을 위한 최적 조건을 확립하고자 하였다. 또한, 유자원의 활용에 따른 농가의 소득 증대와 합성한 POS와 SOS를 이용하여 artificial cocoa butter를 생산함으로써 효소공정에 의한 기술력을 확보하는 것이다.

### III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구의 초콜릿 제조에 이용되고 있는 코코아버터를 대체할 수 있는 artificial cocoa butter를 구성하는 POS/SOS의 triacylglycerol들을 친환경 효소적 esterification 반응을 회분식(batch reactor)과 연속식(packed-bed reactor)에서 수행하였다. 이로서 artificial cocoa butter 합성을 위한 최적 조건을 확립하기 위하여 2개의 세부과제로 구성되어 있다.

#### • 제1세부과제 :

본 연구자는 인조 코코아버터(artificial cocoa butter)의 구성원료인 POS (1-palmitoyl-2-oleoyl-3-stearoyl-sn-glycerol)/SOS(1,3-distearoyl-2-oleoyl-sn-glycerol) 합성을 위한 최적 반응 조건 확립(효소적 공법)과 분석방법 확립, 이를 정제하기 위한 분획(solvent fractionation)조건 확립, 마지막으로 artificial cocoa butter 제조를 통한 물성 규명을 함으로써 기업체에서 필요한 핵심기술력을 이전하는 것을 최종 목표로 하였다.

- 효소적 공법에 의한 POS/SOS 합성 최적화 조건 확립(회분식) 및 특성 연구
  - 카놀라유의 반응 표면 분석을 통한 코코아버터 유사 재구성지질 합성 최적화 연구(기질비율, 효소양, 반응시간)
  - Camellia oil의 반응 표면 분석을 통한 코코아버터 유사 재구성지질 합성 최적화 연구(기질비율, 효소양, 반응시간)
- 효소적 공법에 의한 POS/SOS 합성 최적화 조건 확립(연속식)
  - 연속식 반응기(packed-bed reactor)를 이용한 코코아버터 유사지의 효소적 합성 연구(효소양, 기질유량, 기질 몰비율)
  - 연속식 반응기에서 합성한 반응물의 triacylglycerol(TAG) 조성, 지방산 조성, symmetrical TAG 조성 분석
- 효소적 공법(연속식)에 의하여 합성한 반응물의 정제법(fractionation)연구 및 물리화학적 특성 연구
  - 효소적 공법(연속식)에 의하여 합성한 반응물의 fractionation 수행 및 수율(yield, %)
  - 효소적 공법(연속식)에 의하여 합성 후 정제(fractionation)한 반응물의 특성연구

• 제1협동과제 :

본 연구자는 유지분야 사업에 종사하며 유지의 정제 관련한 최고기술력을 보유하고 있다. 대량 합성한 반응물의 정제 및 실험실 Scale의 합성을 기업화하기 위한 분획 (fractionation) 등을 수행하는 것을 최종 목표로 하였다.

- 팔미트산/스테아린산 에틸에스테르(palmitic/stearic ethylester) 대량합성 및 정제법 확립
  - 팔미트산 에틸에스테르의 대량합성
  - 스테아린산 에틸에스테르의 대량합성
- 효소적 공법에 의한 회분식 에스테르 교차 대량 합성 및 고진공 박막 증류 장치 (TFE, High Vacuum Thin Film Evaporatoe)를 이용한 TAG/Ethylester의 분리
  - 효소법에 의한 회분식 에스테르 교차 대량합성
  - 고진공 박막 증류 장치(TFE, High Vacuum Thin Film Evaporator)를 이용한 TAG/Ethylester의 분리
- 용매(아세톤)를 이용한 TAG의 대량 분획법 확립 및 초콜릿 제조
  - 용매(아세톤)를 이용한 TAG의 대량 분획법 확립
  - 대량합성 루 얻어진 코코아버터 유사지를 이용한 초콜릿 제조

#### IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

##### 1. 효소적 공법에 의한 POS/SOS 합성 최적화 조건 확립(회분식) 및 특성 연구

###### (1) 카놀라유의 반응 표면 분석을 통한 코코아버터 유사 재구성지질 합성 최적화 연구

- 본 연구에서는 카놀라유(canola oil)를 이용하여 코코아버터 유사 재구성지질 합성의 최적조건을 연구하였다. 반응기질로는 카놀라유와 palmitic ethyl ester와 stearic ethyl ester를 이용하였으며, 효소는 Lipozyme TLIM을 사용하여 반응기질의 몰비율과 반응효소의 양, 반응시간을 독립변수로 하고, D-optimal 계획에 의한 반응표면분석에 따라 합성을 실시하였다. 반응을 통해 acyl-migration은 최소로 일어나며, POS 및 SOS, POP의 함량은 최대로 합성되는 조건을 최적화 조건으로 결정하였다.
- D-optimal 계획에 의한 반응 표면 분석을 실행한 결과, sn-2 위치 지방산 조성의 변화를 일으키는 acyl-migration( $Y_1$ )은 최소로 일어나고 POS( $Y_2$ )와 SOS( $Y_3$ ), POP( $Y_4$ )는 최대로 일어나는 조건은 기질의 몰비율은 canola oil:palmitic ethyl ester:stearic ethyl ester=1:3:9이며, 반응효소의 양은 6%이고, 반응시간은 40 min 이었다. 이와 같은 반응 조건으로 합성된 재구성지질의 acyl-migration(% of palmitic acid+stearic acid,  $Y_1$ )은 10.43%, POS( $Y_2$ )의 함량은 25.31%, SOS( $Y_3$ )는 19.79%, 그리고 POP( $Y_4$ )는 11.22%로 측정되었다.

(2) Camellia oil의 반응 표면 분석을 통한 코코아버터 유사 재구성지질 합성 최적화 연구

- Camellia oil과 palmitic, 그리고 stearic ethyl ester를 기질로 하고 Lipozyme TLIM을 촉매로 이용하여 interesterification을 통한 POS를 많이 함유한 반응물을 합성하고자 하였다. 반응 조건(반응효소비율, 반응시간, 기질의 비율)을 독립변수로 하여 중심 합성 계획에 의한 반응 표면 분석을 통하여 POS의 함량은 높이고, sn-2 position의 acyl migration을 낮추어 합성하는 최적화 조건을 얻었다.
- POS를 많이 함유한 반응물의 합성 최적화 조건은 반응 효소양( $X_1$ )= 5.9%, 반응시간 ( $X_2$ )= 60 min, 그리고 기질비율( $X_3$ )= 1:3(1 mole의 camellia oil: 3 mole의 palmitic ethyl ester + 3 mole의 stearic ethyl ester)이었다.
- 이와 같은 조건으로 획득된 실제 효소 반응 합성물의 TAG-P/O/S(palmitic, stearic과 oleic 지방산을 각각 1 분자씩 어느 위치이던지 함유한 TAG, 즉 POS 및 PSO/OSP/OPS/SPO)의 합성율( $Y_1$ )은 20.19%이었고, 이때 acyl migration 등에 의하여 sn-2 위치에 결합(이동)한 palmitic과 stearic acid의 양(P/S-sn-2)인  $Y_2$ 는 12.71% 이었다.

## 2. 효소적 공법에 의한 POS/SOS 합성 최적화 조건 확립(연속식)

(1) 연속식 반응기(packed-bed reactor)를 이용한 코코아버터 유사지의 효소적 합성 연구

- 카놀라유(Ca)와 palmitic ethyl ester(PEE), stearic ethyl ester(StEE)의 기질 몰비율을 1:2:2, 1:2:4, 1:2:6, 1:3:6 (w/w/w)로 하여 Lipozyme TLIM의 양(100g, 125g, 150g)별로 충전되어 있는 연속식반응기에서 기질유량(8 g/min, 13 g/min)에 따라 코코아버터 유사지를 합성하였다.
- 반응물의 triacylglycerol 조성 분석결과, 카놀라유로부터 유래된 OOO의 함량이 낮을수록 PEE/StEE와의 반응이 더 진행되었음을 알 수 있었다. 따라서 카놀라유로부터 유래된 OOO의 area%가 각 효소별로 유량이 낮을수록 감소하는 경향을 나타내었다.
- 연속식 반응기에서 충전되어 있는 효소의 양이 높을수록 생성되는 POP/POS/SOS의 함량은 높아졌으며, 각 기질의 몰비율에서 기질의 유량이 낮을수록 그리고 StEE의 기질 비율이 증가할수록 POS와 SOS의 함량이 증가하는 경향을 나타내었다.

(2) 연속식 반응기에서 합성한 반응물의 지방산 조성과 symmetrical TAG 조성 분석

- Lipozyme TLIM 으로 각각 100 g, 125 g, 150 g으로 충전되어 연속식 반응기에서 카놀라유(Ca)와 palmitic ethyl ester(PEE), stearic ethyl ester(StEE)를 기질 몰비율 (Ca:PEE:StEE, 1:2:2, 1:2:4, 1:2:6, 1:3:6)별로 기질의 유량을 8 g/min과 13 g/min으로 각각 설정하여 반응을 수행하였다.
- 반응물에서 palmitic acid(C16:0, P)와 stearic acid(C18:0, S) 함량이 증가할수록 카놀라유에서 palmitic acid와 stearic acid의 합성율이 증가함을 나타낸다. 기질 몰비율 (Ca:PEE:StEE, 1:2:2, 1:2:4, 1:2:6, 1:3:6)에서 효소양이 클수록 그리고 기질 유량이 낮

을수록 palmitic acid와 stearic acid의 합성율이 높아지는 경향을 나타내었다.

- 사용되는 효소의 양의 많을수록, 그리고 기질의 유량이 낮을수록 acyl migration으로 인한 sn-2 위치에서 palmitic acid와 stearic acid의 합성율이 증가함을 확인하였다. 기질의 몰비율들(1:2:2, 1:2:4, 1:2:6, Ca:PEE:StEE)에서는 기질들의 비율이 증가 할수록 조금씩 증가하는 경향을 나타내었다.
- 합성한 반응물에서 부산물인 ethylester를 제거한 후 얻어진 TAG들의 반응물을 SMS(Saturated-Monounsaturated-Saturated)와 SSM(Saturated-Saturated-Mono unsaturated)으로 구분하였다. 대표적인 SMS 형태의 TAG에는 코코아버터에서 대부분을 차지하는 SOS(1,3-distearoyl-2-oleoyl glycerol)/POS(1(3)-palmitoyl-3(1)-stearoyl-2-oleoyl glycerol)/POP(1,3-dipalmitoyl-2-oleoyl glycerol) 를 들 수 있다.
- 연속식 반응기에 충전된 효소의 양이 작을수록 SSM의 함량은 낮았으며, SMM의 조성은 증가하는 경향을 나타내었다. 또한, 기질의 유량이 낮을수록, 그리고 사용된 효소의 양이 높을수록 acylmigration으로 인하여 생성되는 SSM의 함량은 높아지며, SMM의 함량은 낮아짐을 알 수 있었다. ,

### 3. 효소적 공법(연속식)에 의하여 합성한 반응물의 정제법(fractionation) 연구 및 물리화학적 특성연구

#### (1) 효소적 공법(연속식)에 의하여 합성한 반응물의 정제법(fractionation)

- Lipozyme TLIM 으로 각각 100 g, 125 g, 150 g으로 충전되어 있는 연속식 반응기에서 카놀라유(Ca)와 palmitic ethyl ester(PEE), stearic ethyl ester(StEE)를 기질 몰비율별(Ca:PEE:StEE, 1:2:4, 1:2:6, 1:3:6), 기질의 유량별(8 g/min, 13 g/min)로 반응하였다. 이렇게 합성한 반응물을 가지고 증류를 수행하여 ethylester를 제거하고, triacylglycerol(TAG)를 획득한 후 acetone fractionation을 통한 정제를 수행하였다.
- Acetone fractionation은 25℃에서 분획을 수행하여 얻어진 liquid 층을 다시 4℃에서 분획을 수행하여 solid층을 획득하였다. 분획한 4℃ solid 층에는 POP/POS/SOS가 다량 함유되었을 것으로 예측하였다.
- 기질 유량이 낮을수록 4℃ solid 분획층의 수율은 높은 경향을 나타내었다.

#### (2) 효소적 공법(연속식)에 의하여 합성 후 정제(fractionation)한 반응물의 특성 연구

- 코코아버터(CB)의 POP/POS/SOS 조성은 각각 10%, 52%, 36% 이었다. Lipozyme TLIM 효소가 150 g 충전되어 있는 연속식 반응기에서 유량이 8 g/min 일때, 합성한 1:2:6의 몰비율에서는 POP/POS/SOS 조성이 각각 8%, 34%, 52% 이었으며, 1:3:6의 몰비율에서는 POP/POS/SOS 조성이 각각 12%, 43%, 36% 이었다. 또한, 유량이 13 g/min에서 합성한 1:2:6의 몰비율에서는 POP/POS/SOS 조성이 각각 7%, 33%, 50% 이었으며, 1:3:6의 몰비율에서는 POP/POS/SOS 조성이 각각 9%, 42%, 42% 이었다.
- Lipozyme TLIM 효소가 100 g 충전되어 있는 연속식 반응기에서 유량이 8 g/min일 때, POP/POS/SOS 조성이 합성한 1:2:4의 몰비율에서는 각각 6%, 33%, 46% 이었으

며, 1:2:6의 몰비율에서는 각각 9%, 36%, 43% 이었으며, 1:3:6의 몰비율에서는 각각 11%, 41%, 33% 이었다.

- 기질 1:3:6의 몰비율에서는 유량이 13 g/min 일때, 효소양 150 g, 125 g, 100 g에 따라 SMS의 조성은 각각 90%, 93%, 82% 이었으며, SSM의 조성은 3%, 2%, 3%를 나타내었다. 이때 SSM/SMS ratio는 150 g, 125 g, 100 g 일때 각각 3.3%, 2.2%, 3.3% 이었다. 기질 유량이 클수록 SSM/SMS ratio가 낮아지는 경향을 보였으며, 이는 곧 acylmigration이 낮아짐을 의미하였다.

(3) 효소적 공법(연속식)에 의하여 대량 합성 후 정제(fractionation)한 반응물의 특성 연구

- 기질 1:2:2 (Ca: PEE: StEE, w/w/w) 몰비율을 Lipozyme TL IM 효소 125 g으로 충전되어 있는 packed-bed reactor에서 기질의 유량은 8 g/min으로 총 기질무게가 대략 15 kg정도로 반응하여 코코아버터 대체지의 대량합성을 수행하였다.
- 대량 합성한 반응물 15 kg을 증류를 통하여 ethylester를 제거한 후 얻어진 triacylglycerol 반응물은 대략 6 kg 정도 획득하였다. 이를 acetone fractionation을 25°C와 4°C, 6°C(three-step fractionation)에서 분획을 수행한 후 정제하여 코코아버터 유사지를 생성하였다. 이때 분별 후에 획득한 코코아버터 유사지의 총 수율은 13-14% 내외를 나타내었다.
- 분별 후 코코아버터 유사지의 POP/POS/SOS 함량은 각각 13.4%, 51.8%, 32.3%를 나타내었다. 지방산 조성은 palmitic acid, stearic acid, oleic acid의 함량은 각각 21.82%, 42.23%, 42.23% 이었다.

#### 4. 팔미트산/스테아린산 에틸에스테르(Palmitic/Stearic ethylester) 대량합성 및 정제법 확립

(1) 팔미트산 에틸 에스테르의 대량합성

- CBE 합성을 위한 중요한 중간체인 팔미트산 에틸에스테르의 합성을 200 L 급 Pilot 반응기에서 실시하였다. 최종의 팔미트산 에틸 에스테르 94.2 kg(수율 85.8%)을 합성하였다.

(2) 스테아린산 에틸 에스테르의 대량합성

- CBE합성을 위한 또 하나의 중요한 중간체인 스테아린산 에틸 에스테르의 합성을 200L 급 Pilot 반응기에서 실시하였다. 최종의 스테아린산 에틸 에스테르 73.2 kg(수율 85.8%)을 합성하였다.

#### 5. 효소법에 의한 회분식 에스테르 교차 대량합성 및 고진공 박막 증류 장치(TFE, High Vacuum Thin Film Evaporator)를 이용한 TAG/Ethyl ester의 분리

(1) 효소법에 의한 회분식 에스테르 교차 대량합성

- 회분식반응기에서 high oleic oil과 앞절에서 대량합성에 성공한 Stearic ethyl ester(StEE)를 기질 무게비율 비율(56 kg : 78 kg)를 효소(Lipozyme TLIM)의 2.0 kg 을 혼합하여 45℃에서 10시간 동안 2회 반복실험을 실시하였다. 이때 합성된 POS/SOS의 조성은 25%를 나타내었다.

(2) 고진공 박막 증류 장치(TFE, High Vacuum Thin Film Evaporator)를 이용한 TAG/Ethyl ester의 분리

- 진공도 0.2 torr 하에서 220℃ 로 가열하여 약 5 Liter/h의 속도로 원료를 주입하여 139.1 kg의 반응 혼합물을 박막 증류하여 TAG 75.4 kg 과 EE 63.7 kg 분리하는데 성공하였다. 분석결과 TAG는 순도가 99.5% 이상이었다.

## 6. 용매(아세톤)를 이용한 TAG의 대량 분획법 확립 및 초콜릿 제조

(1) 용매(아세톤)을 이용한 TAG의 대량 분획법 확립

- 원료량 5.1 kg을 가지고 1차(25℃)와 2차(4℃), 3차(6℃) 분획을 통하여 최종 635 g의 코코아버터 유사지를 획득하였다.

(2) 대량 합성 후 얻어진 코코아버터 유사지를 이용한 초콜릿 제조

- 대량 합성 후 정제한 코코아버터 유사지 대략 635 g을 가지고 초콜릿(화이트 초콜릿, 다크 초콜릿, 밀크 초콜릿) 3종을 제조하였다.

## 7. 활용 방안

본 과제를 수행함으로써 얻어진 친환경 효소공법을 이용한 artificial cocoa butter의 개발로 국내 식품산업육성을 위한 기초자료로 활용 가능할 것으로 기대된다. 또한, 제조한 artificial cocoa butter 합성은 초콜릿 제품 이외의 다양한 식품 소재원으로도 활용이 가능하다. 초콜릿의 물성에 따라 다양한 적용성을 보일 것으로 기대된다. 또한, 본 과제가 수행한 연구 결과들을 통하여 얻어진 기초 데이터 및 확보된 기술 등을 산학연의 공동 협의 하에 지속적으로 널리 활용한다면 더욱 좋은 성과를 기대해 볼 수 있을 것으로 사료된다.

## SUMMARY

### (영문요약문)

#### I. Title

Development of artificial cocoa butter for industrialization from canola oil by lipase-catalyzed esterification

#### II. Objective and significance

Cocoa butter (CB) is expensive raw material used in the chocolate and confectionery industry. Generally, it is composed of three main symmetrical triacylglycerols (TAGs): 1,3-dipalmitoyl-2-oleoyl-glycerol (POP) 16%, 1(3)-palmitoyl-3(1)stearoyl-2-oleoyl-glycerol (POS) 39%, 1,3-distearoyl-2-oleoyl-glycerol (SOS) 26%, with oleic acid in sn-2 position of TAG molecules. CB shows sharp melting point (melting fast and completely in mouth) and desirable physicochemical properties because of predominant symmetrical TAG composition. Typical fatty acid composition of canola oil (Ca) in mole percentage is: C16:0 4.1%, C18:0 1.9%, C18:1 60.9%, C18:2 19.4%, and C18:3 7.6%. Because of high content of oleic acid at sn-2 position of Ca, it can be considered as a good potential source for CB-like fat (artificial cocoa butter) production.

In this study, conversions of Ca to artificial cocoa butter in a batch reactor and a packed-bed reactor were investigated, respectively. Immobilized sn-1,3 specific TL IM-catalyzed interesterification of Ca with palmitic ethyl ester (PEE) and stearic ethyl ester (StEE) was studied at various reaction parameters such as substrate molar ratio (Ca:PEE:StEE, w/w/w), lipase amount, reaction time, and flow rate of substrates.

#### III. Contents and scope

1. Optimization of POS/SOS production by lipase-catalyzed reaction (Batch reaction) and their characteristic study
  - (1) Optimization of lipase-catalyzed production of structured lipid containing similar composition of triacylglycerols to cocoa butter from canola oil
  - (2) Optimization of POS produced by lipase-catalyzed esterification using response surface methodology
2. Optimization of POS/SOS production by lipase-catalyzed reaction (Continuous reaction)
  - (1) Synthesis of artificial cocoa butter(POS/SOS reactants) in a continuous packed-bed reactor
  - (2) Properties of POS/SOS reactants synthesized in a continuous packed-bed reactor(fatty acid

composition, symmetrical triacylglycerol composition)

3. Fractionation and their physicochemical properties of POS/SOS reactants by lipase-catalyzed reaction (Continuous reaction)
  - (1) Fractionation of POS/SOS reactants synthesized by lipase-catalyzed reaction
  - (2) Physicochemical properties of the fractionated POS/SOS reactants
  - (3) Fractionation and physicochemical properties of POS/SOS reactants produced by the large-scale reaction
4. Large-scale synthesis and their refining process of palmitic/stearic ethylester
  - (1) Scale-up production of palmitic ethylester
  - (2) Scale-up production of stearic ethylester
5. Scale-up production of cocoa butter equivalent by lipase-catalyzed reaction in a batch reactor and separation of TAG and Ethylester
6. Scale-up fractionation of refined artificial cocoa butter and their chocolate preparation

#### IV. Results and opinion

1. Optimization of POS/SOS production by lipase-catalyzed reaction (Batch reaction) and their characteristic study
  - (1) Optimization of lipase-catalyzed production of structured lipid containing similar composition of triacylglycerols to cocoa butter from canola oil
    - Synthesis conditions of cocoa butter equivalent were optimized using response surface method (RSM) by interesterification of canola oil (Ca), palmitic ethyl ester (PEE) and stearic ethyl ester (StEE). The reaction was catalyzed by immobilized lipase (Lipozyme TLIM) from *Thermonyces lanuginosa* to produce structured lipid containing similar composition of triacylglycerols to cocoa butter.
    - Reaction conditions were optimized using D-optimal design with reaction factors as substrate molar ratio of canola oil to palmitic ethyl ester and stearic ethyl ester (Ca:PEE:StEE=1:1:3, 1:1.66:5, 1:2:6, 1:2.33:7, 1:3:9, X1), enzyme ratio (2~6%, X2), and reaction time (30~270 min, X3). The optimal conditions minimizing acyl-migration while maximizing 1-palmitoyl-2-oleoyl-3-stearoyl glycerol (POS), 1,3-distearoyl-2-oleoyl glycerol (SOS), and 1,3-dipalmitoyl-2-oleoyl glycerol (POP) were predicted, resulting in Ca:PEE:StEE=1:3:9, 6% of enzyme ratio, and 40 min of reaction time. The reaction product of structured lipid was synthesized again under the same condition, showing 10.43 area% of acyl-migration, 25.31 area% of POS/PSO, 19.79 area% of SOS, and 11.22 area% of POP.

(2) Optimization of POS produced by lipase-catalyzed esterification using response surface methodology

- 1(3)-Palmitoyl-2-oleoyl-3(1)-stearoyl (POS) glycerol enriched reaction products was synthesized from camellia oil, palmitic ethyl ester, and stearic ethyl ester by lipase-catalyzed interesterification. Response surface methodology (RSM) was employed to optimize for the production of POS enriched reaction product (Y1, %) and content of stearic and palmitic acid at sn-2 position due to acyl migration (Y2, %).
- Reaction factors were enzyme amount (X1, 2~6%), reaction time(X2, 60~360 min), and substrate molar ratio of camellia oil to palmitic ethyl ester and stearic ethyl ester (X3, 1~3 mol). The predictive models for Y1 and Y2 were adequate and reproducible due to no significance lack of fit (0.128 and 0.237) and satisfactory levels of R2 (0.968 and 0.990, respectively).
- The optimal conditions for reaction product for maximizing Y1 while minimizing Y2 were predicted at the reaction combination of enzyme amount; 5.86%, reaction time; 60 min, and substrate molar ratio; 1:3 (3 mole of palmitic and 3 mole of stearic ethyl ester). Actual reaction was performed under the same condition above, and the resulted product contained 20.19% of TAG- P/O/S and 12.71% of saturated fatty acids at sn-2 position.

2. Optimization of POS/SOS production by lipase-catalyzed reaction (Continuous reaction)

(1) Synthesis of artificial cocoa butter(POS/SOS reactants) in a continuous packed-bed reactor

- Artificial cocoa butters were synthesized by the lipase-catalyzed esterification using canola oil (Ca), palmitic ethyl ester (PEE), and stearic ethyl ester (StEE) in a packed-bed reactor. Immobilized Lipozyme TL IM (sn-1,3 specific) was packed into the reactor. The effects of reaction parameters (substrate molar ratio, lipase amount and flow rate) on the conversion of canola oil were investigated.
- For synthesis of artificial cocoa butter in a continuous packed-bed reactor, substrate molar ratios were 1:2:2, 1:2:4, 1:2:6, and 1:3:6 (Ca:PEE:StEE), and the amounts of TL IM-lipase were 150 g, 125 g, and 100 g, respectively. The flow rates of substrates were 8 g/min and 13 g/min.
- In the result of triacylglycerol composition, the content of triolein(OOO) derived from canola oil was reduced in POS/SOS reactants as increasing the content of palmitic acid(C16:0) and stearic acid(C18:0) in TAG molecules of POS/SOS reactants.
- In the reactants synthesized in a packed-bed reactor, the contents of POS and SOS increased when the reactions was carried out with high lipase amount, low flow rate, and high ratio of StEE.

(2) Properties of POS/SOS reactants synthesized in a continuous packed-bed reactor(fatty acid composition, symmetrical triacylglycerol composition)

- In the reactants synthesized in a packed-bed reactor, the increased contents of palmitic acid and stearic acid were observed in reaction conditions with high lipase amount and low flow rate. On the other hand, acylmigration was also observed in reaction conditions with

high lipase amount and low flow rate.

- After removing the ethylesters (the by-products) from POS/SOS reactants, symmetrical TAG composition was presented as SMS(Saturated-Monounsaturated-Saturated) and SSM((Saturated-Saturated-Mono unsaturated). Typical SMS molecules are SOS(1,3-distearoyl-2-oleoyl glycerol), POS(1(3)-palmitoyl-3(1)-stearoyl-2-oleoyl glycerol), and POP(1,3-dipalmitoyl-2-oleoyl glycerol).
- Low level of SSM molecule was observed in reaction conditions operated with low lipase amount and high flow rate.

### 3. Fractionation and their physicochemical properties of POS/SOS reactants by lipase-catalyzed reaction (Continuous reaction)

#### (1) Fractionation of POS/SOS reactants synthesized by lipase-catalyzed reaction

- For the synthesis of artificial cocoa butter in a continuous packed-bed reactor, substrate molar ratios were 1:2:2, 1:2:4, 1:2:6, and 1:3:6 (Ca:PEE:StEE), and the amounts of TL IM-lipase were 150 g, 125 g, and 100 g, respectively. The flow rates of substrates were 8 g/min and 13 g/min.
- Acetone fractionation was carried out to get the main POP/POS/SOS molecules from POS/SOS reactants synthesized in a packed-bed reactor.
- Fractionation was conducted in sequence at 25°C and 4°C, and then the last obtained solid parts contained abundant POP/POS/SOS molecules.
- Among the POS/SOS reactants, the yield (%) of the last obtained solid part was high when it is produced at lower flow rate in a packed-bed reactor.

#### (2) Physicochemical properties of the fractionated POS/SOS reactants

- The contents of POP, POS, and SOS in cocoa butter were 10, 52, and 36%, respectively. In the fractionated POS/SOS reactants synthesized at flow rate of 8 g/min with Lipozyme TLIM of 150 g, the contents of POP, POS, and SOS in 1:2:6 molar ratio were 8, 34, and 52%, respectively. In addition, the contents of POP, POS, and SOS in 1:3:6 molar ratio were 12, 43, and 36%, respectively. In the fractionated POS/SOS reactants synthesized at flow rate of 13 g/min with Lipozyme TLIM of 150 g, the contents of POP, POS, and SOS in 1:2:6 molar ratio were 7, 33, and 50%, respectively. Also, the contents of POP, POS, and SOS in 1:3:6 molar ratio were 9, 42, and 42%, respectively.
- In the fractionated POS/SOS reactants synthesized at flow rate of 8 g/min with Lipozyme TLIM of 100 g, the contents of POP, POS, and SOS in 1:2:4 molar ratio were 6, 33, and 46%, respectively. In addition, the contents of POP, POS, and SOS in 1:2:6 molar ratio were 9, 36, and 43%, respectively. The contents of POP, POS, and SOS in 1:3:6 molar ratio were 11, 41, and 33%, respectively.
- In the fractionated POS/SOS reactants synthesized at flow rate of 13 g/min with substrate molar ratio of 1:3:6 (Ca:PEE:StEE), the SMS contents of each reactant produced with 150 g, 125 g, and 100 g of Lipozyme TL IM were 90, 93 and 82%, respectively. In those condition, the SSM contents were 3, 2, and 3%, respectively. The low ratio of SSM/SMS was observed in the fractionated POS/SOS reactants produced in high flow rate. And that means low acylmigration.

- (3) Fractionation and physicochemical properties of POS/SOS reactants produced by the large-scale reaction
- The scale-up production (approximately 15 kg) of artificial cocoa butter was performed with molar ratio of 1:2:2 (Ca: PEE: StEE, w/w/w) at flow rate of 8 g/min in a continuous bed reactor packed with Lipozyme TLIM of 125 g.
  - The POS/SOS reactant was refined to remove ethylesters and then fractionated by acetone at three-step process (25°C, 4°C, 6°C). The yield (%) of the last obtained solid parts (artificial cocoa butter) was about 13-14%.
  - After fractionation, the contents of POP, POS and SOS in artificial cocoa butter were 13.4, 51.8, and 32.3%, respectively.
4. Large-scale synthesis and their refining process of palmitic/stearic ethylester
- Scale-up production of palmitic ethylester and steric ethylester were carried out in a 200-L pilot reactor. Yields (%) of palmitic ethylester and steric ethylester were 85.8%.
5. Scale-up production of cocoa butter equivalent by lipase-catalyzed reaction in a batch reactor and separation of TAG and Ethylester
- The large-scale production of cocoa butter equivalent(CBE) was performed with weight ratio of 56 kg :78 kg (High oleic oil: StEE) in a batch type reactor with Lipozyme TLIM of 2 kg.
  - The ethylesters in POS/SOS reactants were successfully removed by high vacuum thin film evaporator. Purity(%) of refined TAG molecules was over 99.5%.
6. Scale-up fractionation of refined artificial cocoa butter and their chocolate preparation
- The scale-up fractionation of POS/SOS reactants(1:2:2 molar ratio) was conducted sequentially at 25°C, 4°C, and 6°C by a three-step process. Finally, the refined artificial cocoa butter of 635 g was obtained.
  - Milk chocolate, white chocolate, and dark chocolate were prepared using the refined artificial cocoa butter.

## CONTENTS

### (영 문 목 차)

<b>Chapter 1. Overview of the Project</b> .....	<b>18</b>
Section 1. Justification .....	18
Section 2. Objectives .....	21
<b>Chapter 2. Current status of domestic and foreign technological development</b> ....	<b>23</b>
Section 1. Current status and problem of the related technique .....	23
Section 2. Prospect in Future .....	24
<b>Chapter 3. Contents and results of research and development</b> .....	<b>25</b>
Section 1. Optimization of POS/SOS production by lipase-catalyzed reaction (Batch reaction) and synthesis of stearic/palmitic ethylester .....	25
Section 2. Optimization of POS/SOS production by lipase-catalyzed reaction (Continuous reaction) and large-scale synthesis of POS/SOS molecules and their refining process .....	52
Section 3. Fractionation and its characteristic of POS/SOS reactants by lipase-catalyzed reaction (Continuous reaction) and chocolate preparation from POS/SOS molecules by large-scale production .....	70
<b>Chapter 4. Achievements and contributions to the related fields</b> .....	<b>95</b>
Section 1. Objectives and contents of research and development .....	95
Section 2. Achievements of annual research and development .....	96
Section 3. Contributions to the related fields .....	98
<b>Chapter 5. Applications of the research results</b> .....	<b>100</b>
Section 1. Academic achievements .....	100
Section 2. Application plans on the present project .....	109
<b>Chapter 6. Collected scientific and technical informations from overseas</b> .....	<b>110</b>
<b>Chapter 7. References</b> .....	<b>112</b>

# 목 차

<b>제 1 장</b>	<b>연구개발과제의 개요</b> .....	<b>18</b>
제 1 절	연구개발의 필요성 .....	18
1.	기술적 측면 .....	18
2.	경제·산업적 측면 .....	20
3.	사회·문화적 측면 .....	21
제 2 절	연구개발의 목적 .....	21
1.	연구개발의 목표 및 내용 .....	21
가.	연구개발의 최종목표 .....	21
<b>제 2 장</b>	<b>국내외 기술개발 현황</b> .....	<b>23</b>
제 1 절	국내·외 관련기술의 현황과 문제점 .....	23
1.	국내 제품생산 및 시장 현황 .....	23
2.	국외 제품생산 및 시장 현황 .....	23
제 2 절	개발기술의 산업화 방향 및 기대효과 .....	24
1.	효소적 공정을 이용한 유지생산의 산업화 .....	24
2.	인조 코코아버터(artificial cocoa butter)의 개발 및 산업화 .....	24
<b>제 3 장</b>	<b>연구개발수행 내용 및 결과</b> .....	<b>25</b>
제 1 절	효소적 공법에 의한 POS/SOS 합성 최적화 조건 확립(회분식) 및 산업화를 위한 stearic/palmitic ethylester 합성법 확립 .....	25
1.	효소적 공법에 의한 POS/SOS 합성 최적화 조건 확립(회분식) 및 특성연구(제1세부) .....	25
가.	카놀라유를 이용한 코코아버터 유사지의 효소적 합성 최적화 연구 .....	25
나.	Camellia oil로부터 POS를 함유한 코코아버터 유사지의 효소적 합성 최적화 연구 .....	35
2.	팔미트산/스테아린산 에틸에스테르(palmitic/stearic ethylester) 대량합성 및 정제법 확립(제1협동) .....	46
가.	팔미트산 에틸 에스테르의 대량합성 .....	46
나.	스테아린산 에틸 에스테르의 대량합성 .....	49

제 2 절	효소적 공법에 의한 POS/SOS 합성 최적화 조건 확립(연속식) 및 산업화를 위한 대량 합성 및 정제법 확립	52
1.	효소적 공법에 의한 POS/SOS 합성 최적화 조건 확립(연속식)(제1세부)	52
가.	연속식 반응기(packed-bed reactor)를 이용한 코코아버터 유사지의 효소적 합성 연구	52
나.	연속식 반응기(packed-bed reactor)를 이용한 코코아버터 유사지의 symmetrical 특성 연구	62
2.	효소법에 의한 회분식 에스테르 교차 대량합성 및 고진공 박막 증류 장치(TFE, High Vacuum Thin Film Evaporator)를 이용한 TAG/Ethylester의 분리(제1협동)	67
가.	효소법에 의한 회분식 에스테르 교차 대량합성	67
나.	고진공 박막 증류 장치(TFE, High Vacuum Thin Film Evaporator)를 이용한 TAG/Ethyl ester의 분리	68
다.	효소법에 의한 회분식 에스테르 교차 대량합성 및 고진공 박막 증류 장치(TFE, High Vacuum Thin Film Evaporator)를 이용한 TAG/Ethyl ester의 분리 연구결과	69
제 3 절	효소적 공법(연속식)에 의한 POS/SOS 합성 반응물의 정제법, 물리화학적 특성 연구 및 대량 정제를 통한 초콜릿 제조	70
1.	효소적 공법(연속식)에 의하여 합성한 반응물의 정제법(fractionation) 및 물리화학적 특성 연구(제1세부)	70
가.	효소적 공법(연속식)에 의하여 합성한 반응물의 정제법(fractionation)	70
나.	효소적 공법(연속식)에 의하여 합성 후 정제(fractionation)한 반응물의 특성연구	72
다.	효소적 공법(연속식)에 의하여 대량합성 후 정제(fractionation)한 반응물의 특성 연구	83
2.	용매(아세톤)를 이용한 TAG의 대량 분획법 확립 및 초콜릿 제조(제1협동)	90
가.	용매(아세톤)를 이용한 TAG의 대량 분획법 확립	90
나.	용매(아세톤)를 이용한 TAG의 대량 분획법 확립결과 요약	93
다.	대량 합성 후 얻어진 코코아버터 유사지를 이용한 초콜릿 제조	93
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	95
제 1 절	연구개발의 목표와 내용	95
1.	제 1세부 연구기관	95
2.	제 1협동 연구기관	96
제 2 절	연차별 연구개발 목표와 수행내용 그리고 달성도	96
1.	1차년도(2009)	96
2.	2차년도(2010)	97

3. 3차년도(2011) .....	98
제 3 절 관련 분야의 기여도 .....	98
1. 기술적 측면 .....	98
2. 경제 및 산업적 측면 .....	99
<b>제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획 .....</b>	<b>100</b>
제 1 절 본 연구로부터 발생한 성과 .....	100
1. 국제 SCI급 학술지 논문 발표 .....	100
2. 국내 학술등재지 논문 발표 .....	102
3. 국내외학술대회 발표성과 .....	108
제 2 절 본 연구결과의 활용계획 .....	109
<b>제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....</b>	<b>110</b>
<b>제 7 장 참고문헌 .....</b>	<b>112</b>

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 필요성

### 1. 기술적 측면

- 코코아 버터(cocoa butter, CB)는 카카오(*Theobroma cacao*)의 과실 속 종자(카카오콩)에서 얻어지며, 초콜릿류, 화장품류, 제과류 등에서 주원료로 사용되고 있는 고가의 유용한 유지자원이다(1,2). 기계적인 압착에 의해 얻어지는 코코아 버터는 20°C 이하에서는 고체상태로 존재하다가, 20~30°C에서 녹기 시작하여 35°C 이상에서는 급격히 용해되는 특성 때문에, 입안에서 부드럽게 녹는 느낌과 더불어 시원한 청량감을 주어 고가의 초콜릿 제조에 이용되고 있다(3). 이러한 용해 특성은 코코아버터를 구성하고 있는 주요 triacylglycerol(TAG)이 1,3-dipalmitoyl-2-oleoyl glycerol(POP), 1(3)-palmitoyl-3(1)-stearoyl-2-oleoyl glycerol(POS), 1,3-distearoyl-2-oleoyl glycerol(SOS)와 같은 포화-불포화-포화 형태의 대칭형 TAG를 70%이상 함유하고 있기 때문이다(4).
- 코코아버터는 실온 이하에서는 조직감이 단단하지만, 좁은 온도 범위(약 인체온도인 35°C 내외)에서 급속히 용해되는 특징을 갖고 있으며, 산화에 대해 안정하여 초콜릿처럼 장기간 보존되는 식품에 적합하게 이용이 될 수 있다. 그러나 코코아버터는 초콜릿 및 관련 제과 공업의 원료에서 가장 비싼 원료 중의 하나이므로 경제적인 측면과 불안정한 원료의 공급을 대체하기 위하여 다양한 코코아버터 대체유지들이 개발되고 있는 실정이다(5-7).
- 초콜릿과 초콜릿 관련제품의 시장은 확대되어 큰데 반하여 천연물인 코코아버터는 공급에 한계가 있어 고가이며 가격 변동이 큼. 이로 인하여 코코아버터 대체유지의 개발이 진행되어 왔다. EU 7개국(United Kingdom, Denmark, Finland, Sweden 등)에서는 코코아버터 이외의 식물성 유지(Illipe butter, Palm oil, Sal fat, Shea butter, Kokum gurgi, Mango kernel fat)를 최대 5%(g/100g product)까지만 초콜릿에 첨가할 수 있도록 규정하고 있다. 코코아버터보다 soft한 식물유를 5%이상 첨가할 경우 fat bloom 현상을 초래한다.
- 최근 석유자원 대체에너지 이용확대 필요성이 대두되어 식물유를 이용한 바이오디젤 개발 연구가 급격히 증가하고 있다. 이에 따라 식물유(팜유 등)의 높은 소비로 인한 가격급등으로 원료 수급이 용이하지 않게 되어 이를 대체할 수 있는 인조 코코아버터(artificial cocoa butter)의 개발이 시급한 실정이다. 이에 반하여 artificial cocoa butter의 제조는 국내·외적으로 아직 이루어지고 있지 않다. 이를 대체하기 위하여 유지조성(triacylglycerol, TAG)은 다르지만 유사한 물성을 갖는 코코아버터 대체지(cocoa butter equivalent, CBE)가 이용되고 있다. 코코아버터 대체지조차도 국내에서는 현재 대부분을

국외(스웨덴, 일본 등)에서 수입해 오고 있는 실정이기 때문에 국내 식품업계에서는 코코아버터를 자급할 수 있는 기술력이 필요하다.

- 코코아버터는 TAG조성에서 대칭을 이루는 구조가 75%이상(POS, 34-39%; SOS, 23-30%; POP, 14-17%)함유되어 있다(Figure 1). 이와 같은 대칭형 유지가 많은 것이 초콜릿의 예민한 융점의 원인이 된다. 코코아버터와 유사한 물성을 갖는 CBE는 코코아버터와 상용성(compatibility)이 양호하며, 유사한 polymorphism( $\beta$ -form, V)을 갖지만, 유지 조성면에서는 차이를 보이며 템퍼링이 필요하다.

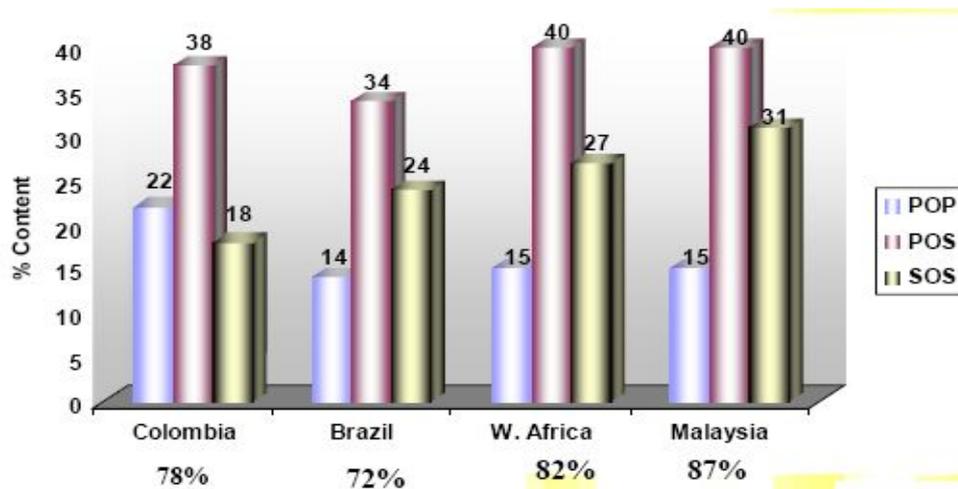


Figure 1. Symmetric triacylglycerol (TAG) profiles in cocoa butters

POP(1,3-dipalmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycerol), SOS(1,3-distearoyl-2-oleoyl-*sn*-glycerol), POS(1-palmitoyl-2-oleoyl-3-stearoyl-*sn*-glycerol)

- 재구성지질(structured lipid, SL)이란 유지의 물리적 또는 화학적 특성을 변화시키거나 공업적, 영양학적 특성을 개선하기 위하여 TAG의 지방산 조성 또는 지방산의 위치(regiospecific position)가 글리세롤 분자 안에서 화학적 또는 효소적 방법에 의해 재합성된 지질을 말한다(8,9). 화학적 합성의 경우에는 에너지의 소비가 크고 부반응이 생겨 유해물질의 잔존량이 문제가 되는 단점이 있으나, 효소 반응은 효소의 기질 및 반응 특이성을 이용하여 반응을 선택적, 효율적으로 할 수 있으며 고정화 효소를 사용할 경우 재사용이 가능하므로 경제적인 장점이 있다(10). 최근 효소 촉매로써 *Thermomyces lanuginosa*로부터 유래한 lipase를 silica gel에 고정화 시킨 Lipozyme TLIM가 널리 이용되고 있다. Lipozyme TLIM은 TAG 분자의 sn-1,3 위치에 선택적으로 작용하는 성질을 가지며, TAG의 ester 결합을 가수분해하여 글리세롤과 지방산으로 분해한 후 다시 esterification 하는 작용을 가진다(11,12).

- 코코아버터는 TAG 조성에서 POS 40%와 SOS 34%, POP 15%으로 구성되어 있다. 팜유의 중간 분획(Fractionation)단계에서 얻어지는 팜중부유(Palm mid fraction, PMF)는 84%의 POP와 9%의 POS로 구성되어 있다. 따라서 친환경적 효소적 공법을 통하여 POS와 SOS의 합성 기술을 획득한 후, PMF와 적절한 비율로 혼합하여 artificial cocoa

butter를 개발하고자 하였다.

- 카놀라유(canola oil)는 유채꽃에서 추출한 기름으로써 품종이 개량되어 식용으로 사용되며, oleic acid의 함량이 높기 때문에 코코아버터 대체지 합성에 적합한 유지이다. 따라서 본 과제에서는 카놀라유와 stearic ethylester(StEE)/palmitic ethylester(PEE)를 기질로하여 Lipozyme TLIM을 이용한 POS/SOS 합성을 위한 최적화 실험을 수행하였다.

## 2. 경제·산업적 측면

- 카놀라유의 원료 재래종 채종은 에루스산(Erucic acid, C22:1)이 다량으로 함유되어 있어 골격근과 심근의 장애, 생육부진 등을 일으키기 때문에 식용으로 판매 금지되고 있다. 따라서 시중에 유통되는 카놀라유(canola oil)는 육종에 의해 안전성을 높인 개량품종으로부터 채취한 유지이다. 카놀라유는 60%의 올레인산과 22%의 리놀산으로 이루어져 있다.
- 본 연구실에서 보유하고 있는 지방산(fatty acid)을 에스테르(fatty acid ethylester)로 전환하는 기술을 활용하여 SOS 합성을 위한 stearic ethylester(StEE)와 POS합성을 위한 palmitic ethylester(PEE)를 합성하고자 한다. 따라서 국내 유자원인 카놀라유와 stearic ethylester/palmitic ethylester를 이용하여 artificial cocoa butter의 구성원료인 SOS와 POS를 합성함으로써 국내 유자원을 육성할 수 있다.
- 친환경 효소적 공법에 의한 재구성지질의 합성은 특정 지방산을 글리세롤 (glycerol)의 특정 위치(regiospecificity)에다가 에스테르(ester)반응을 통하여 생합성할 수 있기 때문에 화학적 공법에 의한 반응보다 특정 TAG를 얻을 수 있다. 이로 인하여 고 부가가치의 원료를 생산할 수 있게 된다.
- 현재 유지 식품산업은 기능성 유지의 생성을 위하여 기질에 대한 특유의 반응 특이성과 선택성을 지니는 효소촉매를 이용한 공정을 채택하고 있다. 효소반응은 낮은 온도에서 이루어져 생산 공정 중 에너지 절감 효과가 크며, 환경 친화적으로 여겨지고 있어 녹색식품 (green food)의 이미지로 각광받고 있기 때문이다.
- 중국 국내시장에서 초콜릿은 매년 10-15% 성장속도로 신속히 발전하고 있고 시장 잠재 소비규모는 200 억 위안이다. 따라서 초콜릿 소비는 중국에서 발전 잠재력이 거대한 시장이다. 본 연구로 인한 국내 제조업체의 경쟁력 육성은 중국 초콜릿 시장을 경향하기 위한 매우 좋은 기회가 될 것이다.
- 국내 초콜릿시장 규모는 약 1천 2백억원 정도이며 코코아 함유 제품까지 포함하면 1천5백억 원대를 훨씬 웃도는 규모이다. 따라서 초콜릿 원료인 코코아버터 혹은 코코아버터 대체지의 수입을 대체할 수 있는 국내 artificial cocoa butter 생산 기술력이 요구된다.

### 3. 사회·문화적 측면

- 소비자 기호의 고급화 및 다양화로 인한 수요증가로 인하여 초콜릿 시장은 날로 급신장하고 있다. 국내 제조업체들은 한국인의 입맛에 맞는 신제품 개발과 품질향상에 주력하는 동시에 artificial cocoa butter 원료의 개발에 힘써야 할 것이다.
- 유한한 코코아버터의 원료를 대체하기 위한 artificial cocoa butter의 제조는 국내 식품업체의 경쟁력 강화와 수출력 증대 등에 기여 할뿐만 아니라 유한한 원료의 사용증대에 따른 식품원료의 폭넓은 활용 및 원료 확보에 크게 기여할 것이다.
- 국내 초콜릿 시장은 소비자 기호의 고급화 및 다양화로 인한 수요증가와 이에 따른 수입 초콜릿의 증가로 꾸준한 신장세를 보일 전망이다. 따라서 국내 제조업체들의 신제품개발, 품질 향상 및 가격인하 등으로 치열한 시장 쟁탈전이 예상된다. 이에 본 기술력은 국내 제조업체뿐만 아니라 국민의 소비욕구에 부응하게 될 것이다.

## 제 2 절 연구개발의 목적

### 1. 연구개발의 목표 및 내용

#### 가. 연구개발의 최종목표

- 본 연구과제의 최종 목표는 커져가는 초콜릿 시장에서 천연물인 코코아버터를 대체할 수 있는 인조 코코아버터(artificial cocoa butter)를 구성하는 POS(1-palmitoyl-2-oleoyl-3-stearoyl-sn-glycerol)와 SOS(1,3-distearoyl-2-oleoyl-sn-glycerol) 합성을 위한 최적 조건을 확립하고자 한다. 또한, 유자원의 활용에 따른 농가의 소득 증대와 합성한 POS와 SOS를 이용하여 artificial cocoa butter를 생산함으로써 효소공정에 의한 기술력을 확보하여 국내 제조업체의 경쟁력을 높이며, 수출력을 증대하는 것이 최종 목표이다.

#### • 제 1 세부과제 :

- ▶ 본 연구자는 인조 코코아버터(artificial cocoa butter)의 구성원료인 POS(1-palmitoyl-2-oleoyl-3-stearoyl-sn-glycerol)/SOS(1,3-distearoyl-2-oleoyl-sn-glycerol) 합성을 위한 최적 반응 조건 확립(효소적 공법)과 분석방법 확립, 이를 정제하기 위한 분획(solvent fractionation)조건 확립, 마지막으로 artificial cocoa butter 제조를 통한 물성 규명을 함으로써 기업체에서 필요한 핵심기술력을 이전하는 것을 최종 목표로 하였다.

- Artificial cocoa butter를 구성하는 POS/SOS 합성을 위한 최적 조건(기질의 몰비율 등 반응정도)을 확립하고자 하였다(회분식과 연속식 반응).
- 또한, 합성한 반응물로부터 순수한 POS/SOS 정제를 위하여 분획조건(용매/기질 비율, 분획온도 등) 확립하고자 하였다.
- Artificial cocoa butter의 제조에 따른 물리적·화학적 특성 분석(triacylglycerol profile, 지방산 조성, melting and crystallization behavior 등) 및 평가를 수행하고자 하였다.

• 제 1 협동과제 :

▶ 본 연구자는 유지분야 사업에 종사하며 유지의 정제 관련한 최고기술력을 보유하고 있다. 대량 합성한 반응물의 정제 및 실험실 Scale의 합성을 기업화하기 위한 분획(fractionation) 등을 수행하는 것을 최종 목표로 하였다.

- 지방산(stearic acid, palmitic acid)으로부터 에스테르(stearic ethyl ester, palmitic ethyl ester)의 대량합성 및 정제법 확립을 확립하였다.
- 합성한 반응물의 정제(TAG 획득)를 위한 분석조건 확립(short path distillation) 및 정제 방법 선정하였다.
- POS/SOS 정제 및 농축을 위한 대량 분획(fractionation) 조건을 확립 및 초콜릿을 제조하였다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절. 국내·외 관련기술의 현황과 문제점

#### 1. 국내 제품생산 및 시장 현황

- 국내업체에서 코코아버터 대체지(cocoa butter replacer)를 생산하고 있다. 이는 저급 초콜릿에 이용되는 코코아버터 유사지로 기존에는 수소첨가반응을 수행하여 높은 트랜스 지방을 함유하고 있었다.
- 양질의 코코아버터를 비롯한 cocoa butter equivalent는 대부분이 수입되고 있는 실정이며, artificial cocoa butter는 시중에 유통되고 있지 않다.

#### 2. 국외 제품생산 및 시장 현황

- 일본 후지사(Fuji Oil)는 효소적 interesterification 방법에 의하여 코코아버터 대체지(cocoa butter equivalent, CBE)를 합성하고 있다. 일본의 Osaka와 미국 조지아의 Savannah에 공장도 설립하였다(2007, AOCS exhibition). 원료 제품으로는 Melano New Series(cocoa butter alternatives)와 Melano SS series (anti-blooming and heat) 등이 있으며 이를 이용하여 다양한 고급 초콜릿을 생산하고 있다(Fuji Oil Co., LTD.). 반면에 artificial cocoa butter는 생산되고 있지 않다.
- AarhusKarlshamn(AAK)기업은 세계적인 유지기업의 하나로 양질의 CBE를 생산하고 있다([www.aak.com](http://www.aak.com)). 제품으로는 ILLEXAO<sup>TM</sup>CB(5% replacement of cocoa butter), ILLEXAO<sup>TM</sup>HS(5% or more to improve heat tolerance), ILLEXAO<sup>TM</sup>BR(for improved bloom stability) 등이 있다. 현재 시중에는 artificial cocoa butter가 제품화 되고 있지 않다.
- 2006년 중국 초콜릿 시장분석 보고서에 따르면, 중국의 초콜릿 시장은 세계에서 가장 발전 잠재력이 크며, 중국 국내시장에서 초콜릿은 매년 10-15% 성장속도로 발전하고 있고 시장 잠재 소비규모는 200억 위안이다.
- 코코아버터 증량용 대체유지류들 중에서 cocoa butter equivalent의 글로벌 시장 규모는 2000년 약 60톤이었고, 이는 2007년 117톤으로 증가하였으며, 2012년 약 160톤일 것으로 예상됨 (World Report 2008). 또한 브라질, 중국 등 신생 개발국들의 경제수준이 높아짐에 따라 고급 초콜릿의 수요가 증대될 것으로 예상되며, 따라서 이에 사용되는 cocoa butter equivalent의 수요도 증가 될 것임. 그러나 현재 글로벌 공급업체는 일본 및 유럽의 회사들이 대부분을 차지하고 있음.
- 현재 천연 코코아 버터의 시장 가격은 kg당 약 8,000-10,000원인 것으로 보여지나 이는 코코아열매의 작황에 따라 변화가 큼. Cocoa butter equivalent는 제조방법에 따라 약 6,000-8,000원의 가격을 형성하는 것으로 보여짐. 본 공정방법은 pilot제조이기 때문에 제조의 경제성이 고려될 수 없으나, 제조규모가 현 공급업체와 유사하다면 원가형성은 현재

상업용 공급가와 큰 차이가 없을 것으로 보임. 국내외 초콜릿 제조 업체 및 코코아버터 대체지 공급업체를 주 마케팅 대상 업체로 함.

## 제 2 절. 개발기술의 산업화 방향 및 기대효과

### 1. 효소적 공정을 이용한 유지생산의 산업화

- 기존의 가공유지는 화학적 촉매를 사용하기 때문에 고 에너지이용, 정제(용제의 잔류 문제) 등의 문제점을 안고 있었다.
- 환경 친화적인 효소적 공법은 낮은 온도에서의 반응으로 높은 에너지가 요구되지 않으며, 재사용이 가능 할뿐만 아니라 쉽게 회수가 이루어져 산업화가 용이하다.
- 효소적 공정의 산업화로 artificial cocoa butter 뿐만 아니라 기타 가공유지의 에스테르 교환반응에도 적용할 수 있기 때문에 경제적이다.

### 2. 인조 코코아버터(Artificial cocoa butter)의 개발 및 산업화

- 국내에서 제조 가능한 코코아버터 유사지에는 저급의 cocoa butter replacer가 있다. 제품의 고급화와 국내 식품제조업체의 경쟁력 강화를 위하여 cocoa butter와 유지(triacylglycerol, TAG) 조성이 유사한 유사지(artificial cocoa butter)의 개발은 꼭 필요한 연구이다.
- 본 연구의 개발 및 산업화로 유지를 이용한 산업(기능성 화장품, 모유지방대체지 등)을 육성함으로써 큰 파급효과가 예상된다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절. 효소적 공법에 의한 POS/SOS 합성 최적화 조건 확립(회분식) 및 산업화를 위한 Stearic/Palmitic ethylester 합성법 확립

#### 1. 효소적 공법에 의한 POS/SOS 합성 최적화 조건 확립(회분식) 및 특성 연구(제1세부과제)

##### 가. 카놀라유를 이용한 코코아버터 유사지의 효소적 합성 최적화 연구

본 연구에서는 코코아버터와 유사한 triacylglycerol(TAG) 조성(즉, POS, SOS, POP와 같이 포화-불포화-포화지방산으로 구성 되어진 대칭형 TAG)을 가진 재구성지질을 합성하기 위하여 sn-2 위치에 oleic acid의 함량이 높은 카놀라유와 palmitic ethyl ester(PEE) 및 stearic ethyl ester(StEE)를 기질로 사용하고 sn-1,3 위치 선택성을 가진 Lipozyme TLIM를 촉매로 이용하여 세가지 반응 요인들(기질비율, 반응효소양, 반응시간)에 따른 합성 반응조건을 반응 표면 분석법으로 최적화하였다. 이때 종속변수로써 코코아버터의 대표 TAG 형태이면서 대칭형 TAG 분자들인 POS, SOS, POP의 합성량을 살펴보았다. 한편, 효소 반응중에 대칭형 TAG 이외에 비대칭형인 PSO, SSO, PPO 등이 생성될 수 있는데, 이들의 생성정도를 알아보기 위하여 acyl-migration(TAG의 sn-2 위치에 존재하는 palmitic acid+stearic acid %)도 함께 종속변수로 고려하였다.

##### (1) 반응 표면 분석을 통한 코코아버터 유사 재구성지질 합성 최적화 연구

D-optimal 계획을 이용한 반응표면분석을 수행하기 위하여 예비조건을 선정하고 이에 따라 합성된 재구성지질의 TAG 조성 및 sn-2 위치의 지방산 조성을 분석한 결과, 특히 1:3:9(Ca:PEE:StEE)의 비율에서 코코아버터와 유사한 TAG(%) 조성을 나타내었다. 이는 StEE의 비율을 PEE보다 3배정도 높이면 카놀라유의 triolein에 StEE가 더 많이 결합하기 때문에 POS와 SOS의 합성량이 POP보다 증가하기 때문이다. 이 결과를 바탕으로 본 실험에서는 독립변수( $X_n$ )로 기질의 비율(Ca:PEE:StEE=1:1:3, 1:1.66:5, 1:2:6, 1:2.33:7, 1:3:9,  $X_1$ ), 반응효소양(2~6%,  $X_2$ )을 각각 5단계로 부호화 하였으며, 반응시간(30~270 min,  $X_3$ )은 4단계로 설정하였다. 또한 종속(반응)변수로( $Y_n$ ) acyl-migration( $Y_1$ , sn-2 위치의 palmitic acid+stearic acid %), POS%( $Y_2$ ), SOS%( $Y_3$ ), POP%( $Y_4$ )로 하여 19개의 설정된 실험 조건에서 반응을 수행하였다. 각 대칭형 POS, SOS, POP의 area(%)은 RP-HPLC에서 얻어진 해당 peak의 area%로 나타냈는데 각 peak는 대칭형 TAG 뿐만 아니라 비대칭형 TAG인 PSO/OPS/OSP, SSO, PPO 등도 포함할 수 있고 이는 대부분 acyl migration 때문이다. 이들 비대칭형 TAG의 양은 sn-2 위치의 palmitic acid와 stearic acid의 양으로 유추할 수 있기 때문에 이를  $Y_1$  종속(반응)변수로 이용하였으며, 모든 RSM 결과는 Modde version 5.0

software(Umetrics, Umea, Sweden)을 이용하여 분석하였다. 각 조건에 따른 재구성지질의 합성을 위하여 각각의 기질 비율에 맞춰 뚜껑이 있는 삼각플라스크에 넣고, 정해진 비율의 Lipozyme TLIM을 혼합하여 shaking water bath(Vision scientific co., Buchun, Korea)에서 220 rpm과 46°C의 조건으로 반응시간별로 시료를 채취하여 PTEF syringe filter(25 mm, 0.5 µm)로 여과하여 냉동 보관하였다.

## (2) 지방산 조성 및 TAG 조성

카놀라유(Ca)의 주요 지방산은 oleic acid(C18:1)가 64.35 area%로 가장 높은 비율을 나타냈으며, palmitic acid(C16:0)와 stearic acid(C18:0)는 각각 4.43와 2.01 area%로 palmitic acid가 약 3배의 높은 함량을 나타내었다(Table 1). 또한 HPLC를 이용하여 TAG 조성을 분석한 결과 Fig. 2와 Table 1에서 나타내어진 바와 같이 지방산에서 가장 높은 비율을 나타낸 oleic acid로 이루어진 triolein이 42 area%의 높은 비율을 나타냈으며, 다음으로 1-linoleoly-2,3-dioleoly glycerol, LOO)이 26.51 area%이었다. 코코아버터의 지방산 조성은 stearic acid의 함량이 37.83 area%로 가장 높았으며, 다음으로 33.03 area%의 oleic acid와 25.38 area%의 palmitic acid이었다. 코코아버터의 sn-2 위치 지방산 조성은 oleic acid가 88.68 area%로 가장 높았으며 sn-1,3 위치의 지방산은 stearic acid 55.68 area%로 가장 높았으며 다음으로 palmitic acid 37.30 area%로 높은 비율을 나타내었다. 코코아 버터의 TAG조성은 POS가 50.79 area%, SOS가 33.10%, POP가 13.38%로 나타났다(Fig. 2, Table 1). 한편, Fig. 3는 1:3:9(Ca:PEE:StEE) 반응기질 비율에서 수행된 예비실험에 의하여 합성된 재구성지질의 TAG 조성이 코코아버터의 TAG 구성과 유사한 경향을 보이는 POS>SOS>>POP의 순으로 합성되는 것을 보여주고 있다. 그 이유는 StEE의 비율을 PEE보다 약 3배가량 높이면, Ca에 주된 TAG 성분인 triolein에 StEE가 결합 할 기회가 더 높아져서 POS와 SOS의 생성이 POP보다 증가한 것으로 추측된다. 이에 따라 PEE보다 StEE의 비율이 높아야 대칭형(포화-불포화-포화)인 TAG중에서도 POS와 SOS의 생성을 높일 수 있었으나, 반응시간이 길어질수록 포화-포화-포화지방산들로 구성되어진 다른 TAG(ex, PSS, SSS 등)의 합성도 증가되는 것을 볼 수 있었다.

**Table 1. Fatty acid compositions and triacylglycerol (TAG) compositions of canola oil and cocoa butter**

Fatty acid (area%)	Canola oil			Cocoa butter			Structured lipid <sup>1)</sup>											
	Total	sn-2	sn-1,3	Total	sn-2	sn-1,3	Total	sn-2	sn-1,3									
16:0	4.43±0.08	0.79±0.07	6.26±0.15	25.38±0.03	1.54±0.08	37.30±0.01	13.01±0.35	4.85±0.94	17.01±0.42									
18:0	2.01±0.05	0.30±0.03	2.86±0.06	37.83±0.01	2.13±0.11	55.68±0.07	36.27±1.64	5.58±0.28	49.26±0.06									
18:1	64.35±0.84	56.98±0.09	68.03±1.22	33.03±0.04	88.68±0.40	5.20±0.15	35.99±1.78	65.54±1.82	20.72±1.75									
18:2	20.97±0.46	30.86±0.07	16.02±0.73	2.70±0.01	7.27±0.20	0.41±0.08	11.43±0.21	19.81±0.35	7.06±0.44									
18:3(n3)	8.24±0.25	11.06±0.21	6.83±0.28	1.07±0.00	0.37±0.02	1.41±0.00	3.30±0.13	4.22±0.26	2.75±0.25									
Total USFA <sup>2)</sup>	93.56	98.91	90.88	36.79	96.33	6.12	50.72	89.57	30.53									
Total SFA <sup>3)</sup>	6.44	1.09	9.12	63.21	3.67	93.88	49.28	10.43	66.27									
TAG (area%)	LOO	LOP	OOO	POO	POP	SOO	POO	POP	SOO	POS/ PSO	SOS	SSS	LOP	POO	POP	SOO	POS/ PSO	SOS
	26.51	3.07	42.00	4.45	0.14	1.47	0.46	13.38	0.83	50.79	33.10	0.55	6.06	14.56	11.22	12.83	25.31	19.79

<sup>1)</sup>Structured lipid was obtained from the reaction condition; molar ratio of substrate (canola oil:palmitic ethyl ester:stearic ethyl ester)=1:3:9, enzyme amount=6% Lipozyme TLIM, and reaction time=40 min

<sup>2)</sup>Total unsaturated fatty acids (%)

<sup>3)</sup>Total saturated fatty acids (%)

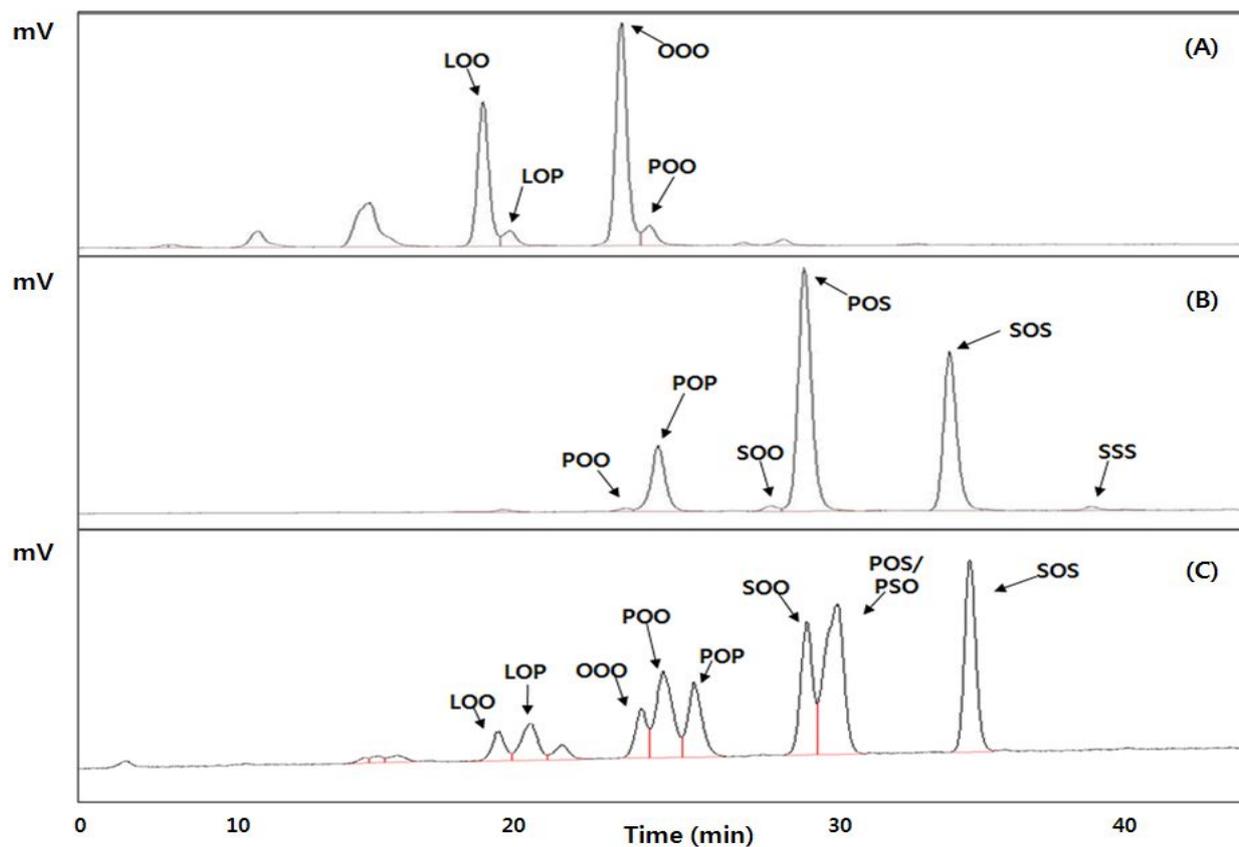
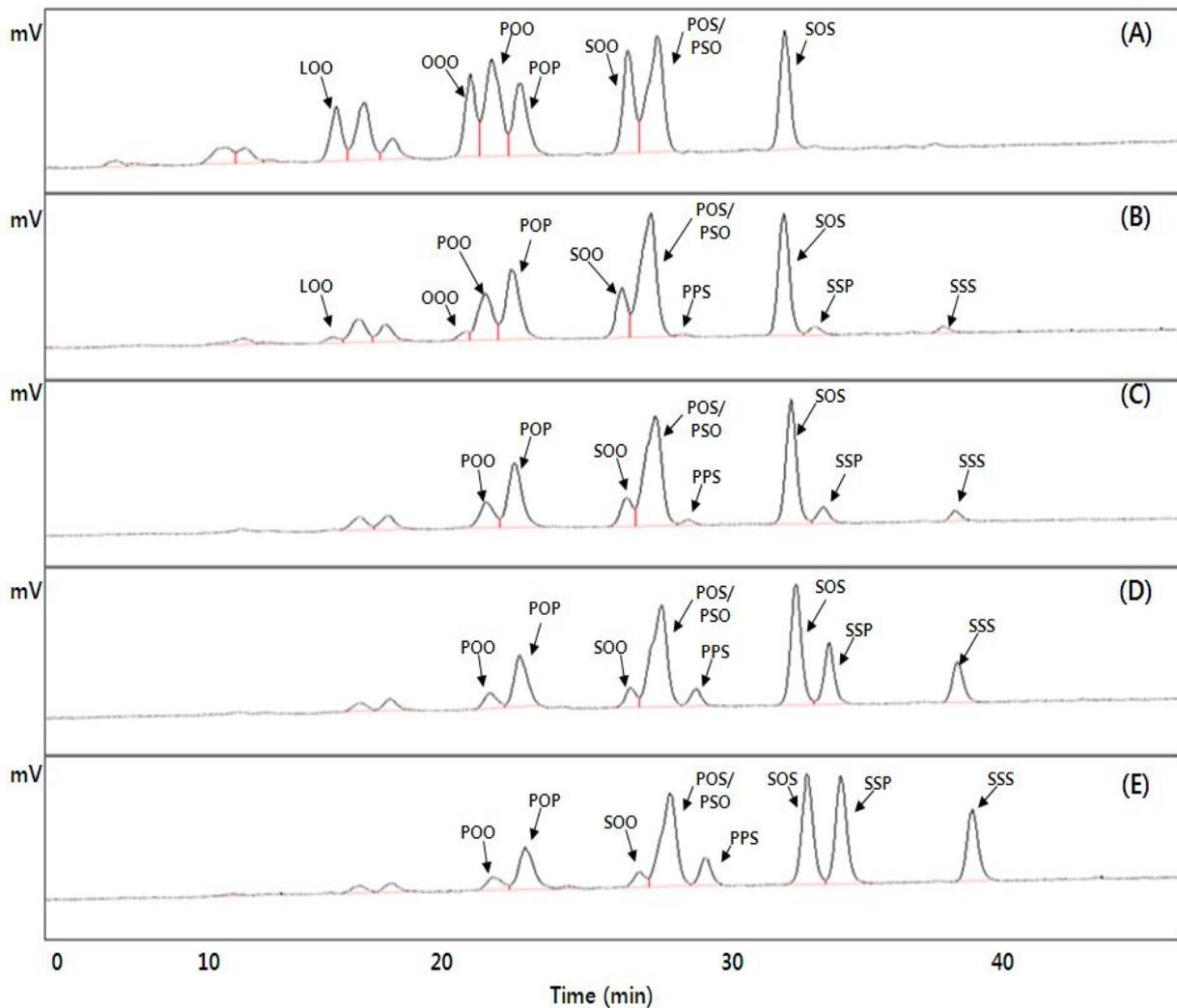


Fig. 2. RP-HPLC chromatograms of canola oil (A), cocoa butter (B) and structured lipid (C) obtained from the condition; molar ratio of substrate=(canola oil:palmitic ethyl ester:stearic ethyl ester)=1:3:9, enzyme amount=6% Lipozyme TLIM, reaction time=40 min.



**Fig. 3.** RP-HPLC chromatograms of structured lipids. (Reaction condition: molar ratio of substrates=canola oil:palmitic ethyl ester:stearic ethyl ester=1:3:9, enzyme amount=5% Lipozyme TLIM, reaction time=1 hr (A), 2 hr (B), 3 hr (C), 6 hr (D), 9 hr (E).) P=palmitic, O=oleic, S=stearic, L=linoleic acid.

### (3) D-optimal 계획을 이용한 반응표면분석

카놀라유(Ca)의 sn-2 위치에 있는 oleic acid를 유지시키면서 sn-1,3 위치에 palmitic acid와 stearic acid의 함량이 높은 코코아버터 대체 재구성지질의 합성 최적화 반응조건을 찾기 위하여 D-optimal 계획에 따라 실험을 하였다. 독립변수는 기질의 비율 (Ca:PEE:StEE=1:1:3, 1:1.66:5, 1:2:6, 1:2.33:7, 1:3:9,  $X_1$ ), 반응 효소양(2, 3.33, 4, 4.66, 6%,  $X_2$ ), 반응시간(30, 90, 180, 270 min,  $X_3$ )으로 설정하였다.

각각 19개의 설정된 실험을 진행한 결과 종속(반응)변수 acyl-migration( $Y_1$ , 즉 sn-2 위치의 palmitic acid+stearic acid %), POS%( $Y_2$ ), SOS%( $Y_3$ ), POP%( $Y_4$ )의 결과는 Table 2에 제시하였다. 반응표면분석법에서 ANOVA의 lack of fit이 0.05 이상인 경우에 모형이 적합한 것이며,  $R^2$ 값은 1에 가까운 수치일수록 좋은 모형임을 나타낸다. 본 D-optimal 계획

에 따른 실험에서 Y<sub>1</sub>에 관한 lack of fit은 0.176, R<sup>2</sup> 값은 0.972 이었으며, Y<sub>2</sub>에 관해선 lack of fit이 0.055, R<sup>2</sup>의 값이 0.953, Y<sub>3</sub>의 lack of fit은 0.128, R<sup>2</sup>의 값은 0.968 이었으며, Y<sub>4</sub>에 대해서는 lack of fit이 0.051, R<sup>2</sup>의 값이 0.932로 모두 적합한 모형을 나타내었고, Y<sub>1</sub>, Y<sub>2</sub>, Y<sub>3</sub>와 Y<sub>4</sub> 모두 P<0.005로 유의적인 수준을 나타내었다. 또한 종속변수에 관한 회귀계수는 Table 3에 나타냈으며, 이를 이용한 반응표면회귀식은 다음과 같다.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} X_i X_j$$

Y<sub>1</sub>(Acyl-migration=palmitic acid+stearic acid % at sn-2 position)

$$=19.282+2.307X_1+ 5.351X_2+10.150X_3-1.182X_1X_1+2.345X_1X_3+2.425X_2X_3+0.038X_3X_3$$

Y<sub>2</sub>(POS, %)=27.116+2.780X<sub>1</sub>+2.876X<sub>2</sub>+4.811X<sub>3</sub>-2.637X<sub>1</sub>X<sub>1</sub>-0.899X<sub>1</sub>X<sub>3</sub>-1.615X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>-4.181X<sub>3</sub>X<sub>3</sub>

Y<sub>3</sub>(SOS, %)=24.013+2.502X<sub>1</sub>+3.197X<sub>2</sub>+5.770X<sub>3</sub>-2.574X<sub>1</sub>X<sub>1</sub>-0.281X<sub>1</sub>X<sub>3</sub>-0.644X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>-3.632X<sub>3</sub>X<sub>3</sub>

Y<sub>4</sub>(POP, %)=11.319+1.278X<sub>1</sub>+1.288X<sub>2</sub>+2.057X<sub>3</sub>-1.033X<sub>1</sub>X<sub>1</sub>-0.400X<sub>1</sub>X<sub>3</sub>-0.803X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>-1.688X<sub>3</sub>X<sub>3</sub>

독립 변수인 기질의 몰비율(X<sub>1</sub>)과 효소의 양(% , X<sub>2</sub>), 반응시간(min, X<sub>3</sub>)들 중 acyl-migration과 코코아버터의 주요 TAG 조성인 POS, SOS, POP의 합성에 영향을 미치는 정도를 알아보았다(Fig. 4, Table 3). 우선 sn-2 위치의 지방산 변화를 가져오는 acyl-migration은 전반적으로 반응시간에 따라 가장 큰 증가치를 보였으며, 반응효소의 양과 기질의 몰비율이 증가할 때에도 다소 증가하는 모습을 보여 주었다(Fig. 3). 이러한 경향은 Xu 등(10)이 연구한 실험에서 acyl-migration은 반응 시간과 효소의 비율에 비례한다는 보고 내용과도 일치하는 결과를 나타내었다. 한편, POS(Y<sub>2</sub>)와 SOS(Y<sub>3</sub>), POP(Y<sub>4</sub>)의 값도 X<sub>3</sub>의 증가가 가장 큰 영향을 끼치는 것으로 나타났다(Table 3). 따라서 본 실험의 결과에서 acyl-migration은 반응시간에 가장 큰 영향을 받았고, 이후 반응효소의 양 그리고 기질의 몰비율의 순으로 영향을 받는다는 것을 알 수 있었다. 이는 효소농도 증가에 따라 재구성지질 함량이 증가하는 Lee 등(13)과 Senanayke 등(14)이 연구한 내용과도 일치하였다. 특히, Y<sub>2</sub>과 Y<sub>3</sub> 그리고 Y<sub>4</sub>는 반응시간(X<sub>3</sub>)이 늘어남에 따라 그 값들이 상승하다가 약 180 min이후 감소하는 경향을 모두 나타내었고, 기질의 몰비율(X<sub>1</sub>)에 대해서도 비율을 높일수록 증가하는 경향을 보인 후 Ca:PEE:StEE=1:2.33:7의 비율에서부터 감소하는 경향을 보였다(Fig. 4). 또한 반응효소의 양(2, 4, 6%)에 따라 반응시간과 기질의 비율의 변화에 따른 acyl-migration 정도(Y<sub>1</sub>)과 POS(Y<sub>2</sub>)의 관계를 등고선으로 나타내보았다. Acyl-migration(sn-2 위치의 palmitic acid+stearic acid area %)의 발생 정도는 사용된 반응 효소량이 같을 경우 기질의 비율(X<sub>1</sub>) 또는 반응시간(X<sub>3</sub>)이 커짐에 따라 높게 나타났다. 따라서 대부분의 고급 코코아버터 대체지인 CBE의 경우에 sn-2위치에 포화지방산이 약 10% 정도 존재하기 때문에 sn-2 위치에 palmitic acid와 stearic acid가 적어도 10%를 넘지 않으려면 반응효소의 양이 6%일 경우에 반응시간은 적어도 50 min은 넘지 않아야 acyl-migration을 최소화하여 코코아버터와 유사한 대칭형 TAG조성을 가진 재구성지질을 합성할 수 있을 것이라는 점을 예측할 수 있었다(Fig. 5).

**Table 2. D-optimal design arrangements and the observed responses**

Exp. No.	Factors <sup>1)</sup>			Responses <sup>2)</sup>			
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Y <sub>1</sub> Observed	Y <sub>2</sub> Observed	Y <sub>3</sub> Observed	Y <sub>4</sub> Observed
1	1:1:3 <sup>3)</sup>	2	30	2.42±0.26 <sup>4)</sup>	1.66±0.19	1.09±0.04	0.83±0.05
2	1:1:3	6	30	3.45±0.21	9.86±0.94	4.91±2.72	3.91±1.11
3	1:3:9	6	30	8.21±0.40	19.26±0.36	15.31±0.37	9.25±0.58
4	1:1.66:5	2	30	3.83±1.51	2.78±0.93	2.33±1.08	1.28±0.12
5	1:3:9	3.33	30	4.90±0.76	12.07±0.88	8.39±3.45	5.58±1.14
6	1:3:9	2	90	9.85±0.12	17.74±0.65	11.42±4.48	6.21±1.72
7	1:2.33:7	6	90	15.94±1.71	31.27±0.54	25.17±0.59	13.08±0.21
8	1:1:3	3.33	90	8.68±1.60	11.35±0.95	8.28±1.12	3.27±2.03
9	1:2.33:7	2	180	12.79±0.83	23.90±0.63	20.75±1.25	10.47±0.49
10	1:1.66:5	6	180	24.75±1.84	27.69±0.72	26.30±1.83	11.49±0.57
11	1:3:9	4.66	180	22.17±0.78	29.39±0.50	27.85±2.69	12.93±0.07
12	1:1:3	2	270	13.26±0.50	16.74±0.75	15.34±1.19	7.31±0.70
13	1:1:3	6	270	28.71±0.41	21.92±0.96	22.05±0.60	10.67±1.99
14	1:3:9	2	270	22.80±0.28	28.33±0.92	24.64±3.96	12.21±1.24
15	1:3:9	6	270	46.10±0.57	25.27±0.46	26.12±1.27	9.84±0.54
16	1:2:6	4	270	29.63±0.60	26.61±0.55	26.19±1.15	12.31±1.32
17	1:2:6	4	270	28.46±1.54	29.11±0.86	24.29±2.66	11.84±0.83
18	1:2:6	4	270	32.30±0.01	27.77±0.37	26.52±1.67	11.69±0.61
19	1:2:6	4	270	30.55±1.55	27.98±0.67	26.91±1.59	11.05±0.77

<sup>1)</sup>X<sub>1</sub>=Molar ratio of reaction substrates (Ca:PEE:StEE),

X<sub>2</sub>=enzyme amount (%), X<sub>3</sub>= reaction time (min)

<sup>2)</sup>Y<sub>1</sub>=sn-2 position of palmitic acid + stearic acid (%),

Y<sub>2</sub>=POS (%), Y<sub>3</sub> = SOS (%), Y<sub>4</sub> = POP (%)

<sup>3)</sup>Molar ratio=canola oil:palmitic ethyl ester:stearic ethyl ester

<sup>4)</sup>Results are means of triplicates±standard deviation

**Table 3. Regression coefficients and significance of the second-order polynomials after backward elimination for Y<sub>1</sub>, Y<sub>2</sub>, Y<sub>3</sub>, and Y<sub>4</sub>**

Variables	Y <sub>1</sub> <sup>4)</sup>		Y <sub>2</sub> <sup>5)</sup>		Y <sub>3</sub> <sup>6)</sup>		Y <sub>4</sub> <sup>7)</sup>	
	Coefficient (β)	P value	Coefficient (β)	P value	Coefficient (β)	P value	Coefficient (β)	P value
Intercept	19.282	3.894×10 <sup>-8</sup>	27.116	7.332×10 <sup>-10</sup>	24.013	3.936×10 <sup>-10</sup>	11.319	7.780×10 <sup>-9</sup>
X <sub>1</sub> <sup>1)</sup>	2.307	4.764×10 <sup>-3</sup>	2.780	1.069×10 <sup>-3</sup>	2.502	6.150×10 <sup>-4</sup>	1.278	2.572×10 <sup>-3</sup>
X <sub>2</sub> <sup>2)</sup>	5.351	4.332×10 <sup>-6</sup>	2.876	7.089×10 <sup>-4</sup>	3.197	6.913×10 <sup>-5</sup>	1.288	2.117×10 <sup>-3</sup>
X <sub>3</sub> <sup>3)</sup>	10.150	1.312×10 <sup>-8</sup>	4.811	1.618×10 <sup>-5</sup>	5.770	4.887×10 <sup>-7</sup>	2.057	9.472×10 <sup>-5</sup>
X <sub>1</sub> X <sub>1</sub>	-1.182	2.048×10 <sup>-1</sup>	-2.637	9.850×10 <sup>-3</sup>	-2.574	3.905×10 <sup>-3</sup>	-1.033	3.909×10 <sup>-2</sup>
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	2.345	3.416×10 <sup>-3</sup>	-0.899	1.684×10 <sup>-1</sup>	-0.281	5.920×10 <sup>-1</sup>	-0.400	2.348×10 <sup>-1</sup>
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	2.425	3.489×10 <sup>-3</sup>	-1.615	2.692×10 <sup>-2</sup>	-0.644	2.486×10 <sup>-1</sup>	-0.803	3.311×10 <sup>-2</sup>
X <sub>3</sub> X <sub>3</sub>	0.035	9.777×10 <sup>-1</sup>	-4.181	4.503×10 <sup>-3</sup>	-3.632	3.525×10 <sup>-3</sup>	-1.688	1.876×10 <sup>-2</sup>

<sup>1)-3)</sup>X<sub>1</sub>=molar ratio of substrates (canola oil:palmitic ethyl ester:stearic ethyl ester), X<sub>2</sub>=enzyme amount (%), X<sub>3</sub>=reaction time (min)

<sup>4)-7)</sup>Y<sub>1</sub>=sn-2 position of palmitic acid+stearic acid (%); Y<sub>2</sub>=POS (%); Y<sub>3</sub>=SOS (%); Y<sub>4</sub>=POP (%)

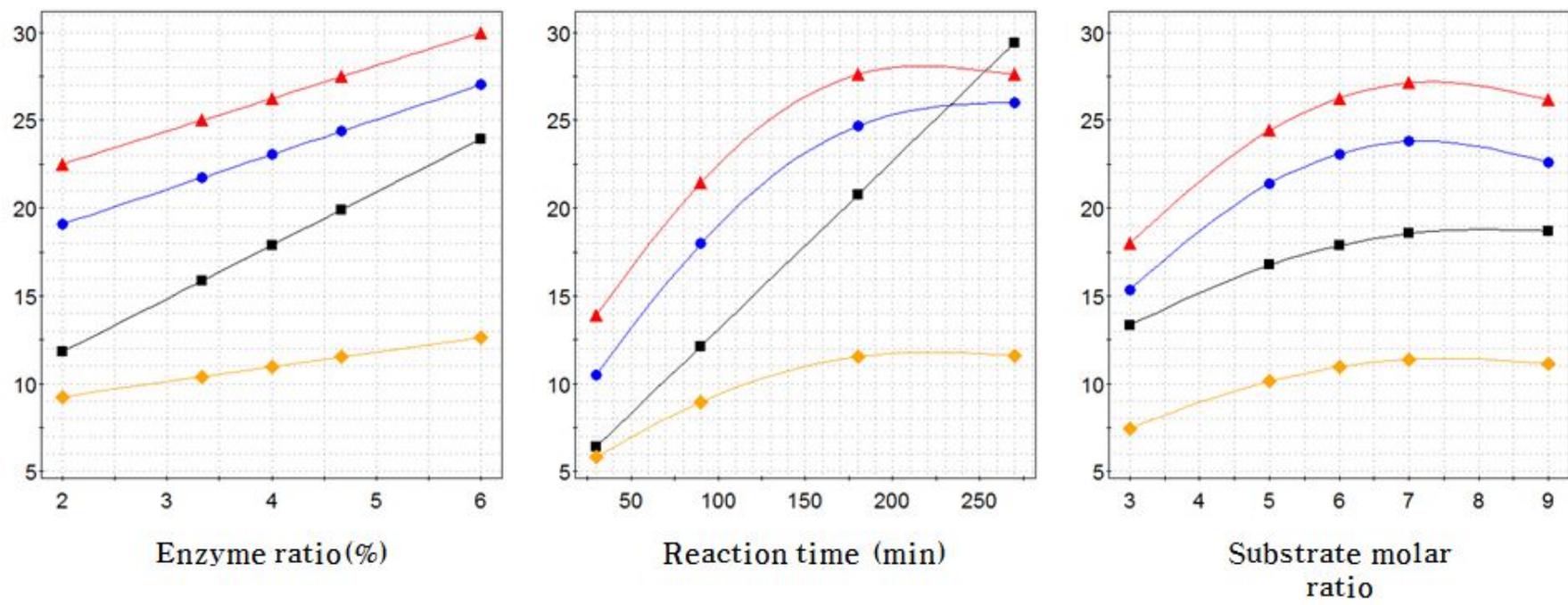


Fig. 4. Prediction plot for Y<sub>1</sub>, Y<sub>2</sub>, Y<sub>3</sub> and Y<sub>4</sub> (■, Y<sub>1</sub>; ▲, Y<sub>2</sub>; ●, Y<sub>3</sub>; ◆, Y<sub>4</sub>). Y<sub>1</sub>=sn-2 position of palmitic acid+stearic acid (%); Y<sub>2</sub>=POS (%); Y<sub>3</sub>=SOS (%); Y<sub>4</sub>=POP (%).

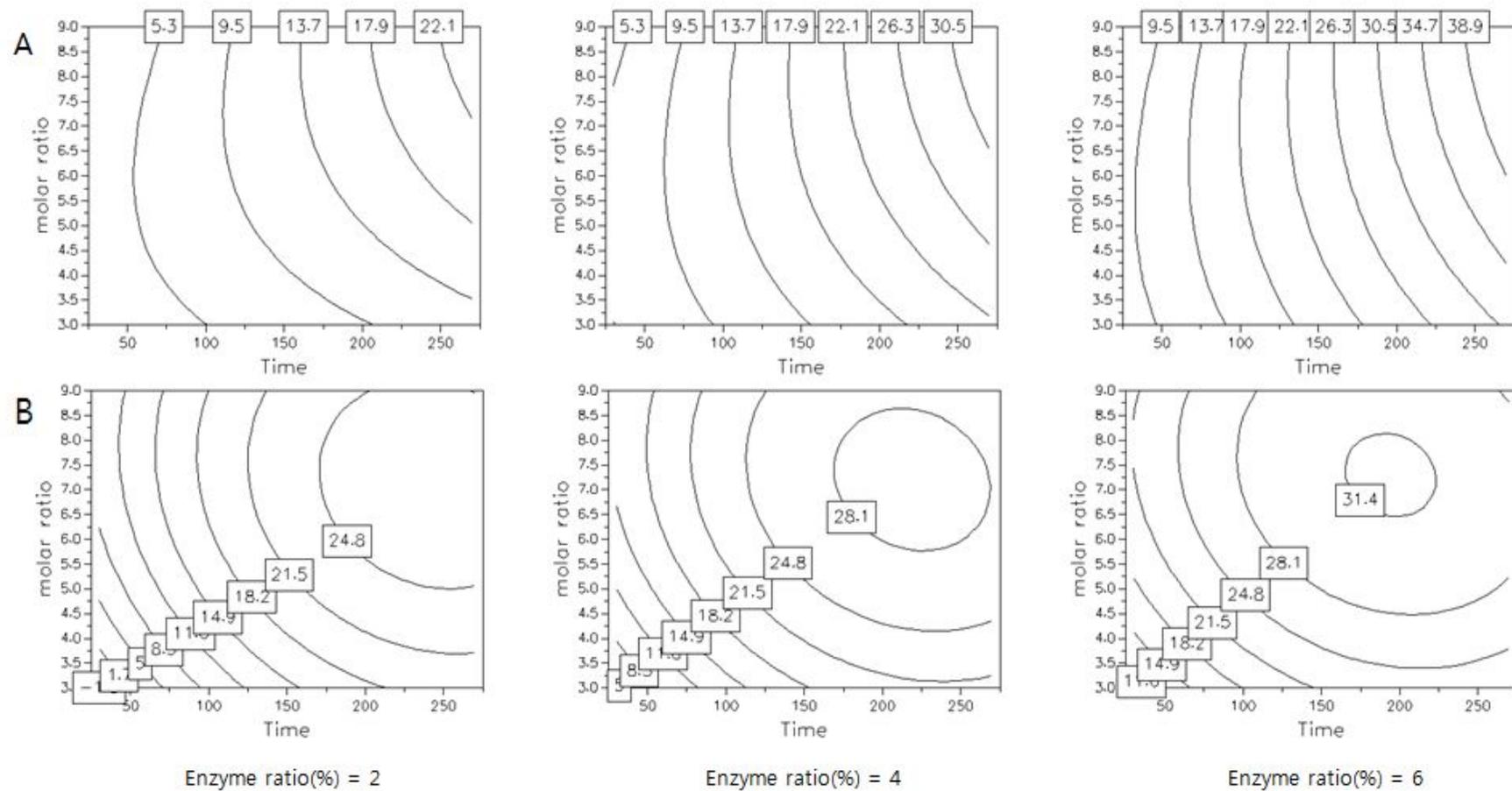


Fig. 5. Response contour plots for  $Y_1$  (A) and  $Y_2$  (B) at different enzyme amount of 2, 4, and 6%.  $Y_1$ =sn-2 position of palmitic acid+stearic acid (%);  $Y_2$ =POS (%).

#### (4) 반응표면분석에 따른 코코아버터 유사 재구성지질의 합성

카놀라유(Ca)와 PEE, StEE를 기질로 하고 Lipozyme TLIM을 이용하여 반응을 한 주된 이유는 코코아버터와 유사한 TAG 조성을 가지는 재구성지질을 합성하는 것이다. 즉, 코코아버터의 70% 이상의 TAG가 포화(saturated)-불포화(unsaturated)-포화(saturated)형의 대칭형 구조를 가지고 있기 때문에, 반응 중 sn-2 위치 지방산 조성의 변화를 일으키는 acyl-migration( $Y_1$ )은 최소로 일어나야 하며 POS( $Y_2$ )와 SOS( $Y_3$ ), POP( $Y_4$ )는 최대로 일어나는 조건을 최적화해야 한다. Modde 5.0을 이용하여 최적화된 반응기질의 몰비율은 Ca:PEE:StEE=1:3:9 이었으며, 반응효소의 양은 6%, 반응시간은 40 min으로써 이때에 acyl-migration(sn-2 위치의 palmitic acid+stearic acid %)은 8.07%, POS의 함량은 22.24%, SOS의 함량은 16.64% 그리고 POP의 함량은 9.87%로 예측되었다. 한편, 최적화 조건에 따라 합성을 진행하여 위치별 지방산을 분석한 결과는 Table 1에 나타내었다. 전체 지방산은 stearic acid 36.27와 oleic acid가 35.99 area%로 나타났으며, 다음으로 palmitic acid가 13.01 area%로 높은 비율을 차지하였다. sn-2 위치에는 oleic acid가 65.54 area%로 가장 많이 함유되어 있었으며 palmitic acid는 4.85 area%, stearic acid는 5.58 area%로 총포화지방산이 10.43 area%로 측정되었다. TAG의 조성은 POS의 함량이 25.31 area%로 가장 높게 나타났으며, 다음으로 SOS는 19.79, POP는 11.22 area%로 나타났다. 총 TAG의 조성 비율에서 포화(saturated)-불포화(unsaturated)-포화(saturated)형의 대칭형 구조 비율이 총 56.32 area%로 나타났으며, 이는 대칭형 TAG의 조성이 높은 유지일수록 코코아 버터의 예민한 용점의 원인이 되는 점과 비교하여 볼 수 있었다.

#### 나. Camellia oil로부터 POS를 함유한 코코아버터 유사지의 효소적 합성 최적화 연구

Camellia oil을 구성하고 있는 TAG 중 약 70%이상이 triolein으로 이루어져 있기 때문에, sn-1,3 위치 선택성이 있다고 알려진 Lipozyme TLIM를 촉매로 이용하여 palmitic과 stearic ethyl ester를 camellia oil과 에스테르반응을 수행하면 POS를 합성할 수 있다. 본 연구에서는 camellia oil과 palmitic 및 stearic ethyl ester를 Lipozyme TLIM으로 반응하여 CB의 주요 TAG 성분인 POS를 많이 함유한 효소반응물을 반응표면분석법(response surface methodology, RSM)으로 최적화 합성을 하고자 하였다. 이를 위하여 효소 양, 반응 시간, 기질의 몰비율을 독립 변수로 하여, 중심 합성 계획에 의한 반응 표면 분석을 이용하였고, 종속변수로서 효소 합성반응물중 TAG-P/O/S(palmitic, stearic과 oleic 지방산을 각각 1 분자씩 어느 위치이던지 함유한 TAG, 즉 POS 및 PSO/OSP/OPS/SPO)의 합성율( $Y_1$ , %)을 높이고자 하였다(14). 한편, 효소 합성반응물의 acyl migration등에 의하여 sn-2 위치에 결합(이동)한 palmitic과 stearic acid의 양(P/S-sn-2,  $Y_2$ , %)을 낮추기 위한 최적화 조건도 살펴보고, 얻어진 RSM 예측 반응조건을 따라 다시 재합성하여 구성 TAG 분자들의 조성을 reversed-phase high performance liquid chromatography(RP-HPLC)로 분석하였다.

(1) 반응 표면 분석법(response surface methodology, RSM) 실험 설계

중심합성실험계획(central composite face design)으로 factor에 반응효소의 양( $X_1 = 2, 4, 6\%$ ), 반응시간( $X_2 = 60, 120, 360$  min), camellia oil에 대한 stearic과 palmitic ethyl ester 기질 몰비율( $X_3 = 1, 2, 3$  mol)을 각각 설정하고, 이 독립변수들을 -1, 0, 1로 3단계로 부호화한 후(Table 4), 17개의 설정된 실험 조건에서 반응을 수행하였다. 이때,  $X_3$ 인 camellia oil에 대한 기질의 몰비율은 stearic과 palmitic ethyl ester기질의 혼합물이므로  $X_3 = 1$ 이라는 것은 Table 4에 설명되어진 것과 같이 1 mole의 camellia oil에 대한 1 mole의 stearic과 1 mole의 palmitic ethyl ester를 의미한다. 종속 변수  $Y_1$ 은 효소 합성반응물중 반응 후 palmitic, stearic과 oleic 지방산을 각각 1 분자씩 어느 위치이던지 함유한 TAG 분자(TAG-P/O/S)의 합성율(%)이고,  $Y_2$ 는 부반응인 acyl migration등에 의하여 생성된 PSO, OPS, OSP, SPO 등의 sn-2 위치에 결합(이동)한 palmitic과 stearic acid의 양(P/S-sn-2, %)이었다. 각 반응은 다음과 같이 진행되었다. Screw cap이 있는 삼각 flask에 중심합성 실험계획에 의해서 주어진 반응조건에 따라 기질인 camellia oil과 stearic과 palmitic ethyl ester를 각각의 molar ratio(1, 2, 3, mol/mol)에 맞게 혼합하였다. 이후 혼합된 기질의 총 부피에 설정된 비율별로 Lipozyme TLIM을 첨가한 후, 설정된 반응시간별로 반응온도인  $46^\circ\text{C}$ 를 유지해가며 200 rpm으로 설정된 shaking water bath(Vision scientific co., Korea)를 이용하여 각각의 반응을 수행하였다. 반응물은 syringe filter( $0.5\mu\text{m}$ , Toyo Roshi kaisha, Japan)를 이용하여 여과하였다.

**Table 4. Level of each independent variable for the central composite design**

Independent variables	$X_i$	Levels		
		-1	0	1
Reaction enzyme amount (%)	$X_1$	2	4	6
Reaction time (min)	$X_2$	60	120	360
Molar ratio	$X_3$	1 <sup>1)</sup>	2 <sup>2)</sup>	3 <sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> $X_3 = 1$  means 1 mole of camellia oil reacted with 1 mole of palmitic ethyl ester and 1 mole of stearic ethyl ester

<sup>2)</sup> $X_3 = 2$  means 1 mole of camellia oil reacted with 2 mole of palmitic ethyl ester and 2 mole of stearic ethyl ester

<sup>3)</sup> $X_3 = 3$  means 1 mole of camellia oil reacted with 3 mole of palmitic ethyl ester and 3 mole of stearic ethyl ester

(2) 중심합성 계획을 이용한 반응 표면분석

Camellia oil과 palmitic과 stearic ethyl ester를 기질로 sn-1,3 위치에 선택적으로 반응하는 Lipozyme TLIM을 이용하여 1(3)-palmitoyl-2-oleoyl-3(1) stearyl glycerol(POS)를 함유한 효소 합성반응물을 생성하고자 하였다. 중심합성계획(central composite face design)을 이용하여 독립변수로써 반응효소의 양( $X_1 = 2, 4, 6\%$ ), 반응시간( $X_2 = 60, 120, 360$  min),

그리고 camellia oil에 대한 stearic과 palmitic ethyl ester의 각각의 기질 비율( $X_3= 1, 2, 3$  mol)을 설정하였다(Table 5). 이는 예비 실험으로 확인 결과 반응효소의 양이 8-10%이상일 경우 POS의 합성시 부반응인 acyl migration이 큰 폭으로 증가하고, 이에 의하여 TAG의 sn-2 위치에 많은 양의 stearic이나 palmitic acid가 존재하는 PSO/OPS/OSP/SPO이 존재할 수 있음을 확인하였기 때문이며, 따라서 이들 부 반응물의 생성량을 최소화하기 위하여 사용될 반응효소의 양이 6%이상 넘지 않게 하였다. 또한 반응 시간이 6시간 이상일 경우 효소 합성반응물의 합성이 둔화되었기 때문에 반응시간을 6시간(360 min) 이내로 정하였다. 이렇게 정해진 17가지 각각의 실험에 대한 효소 합성반응물중 TAG-P/O/S의 합성량( $Y_1, \%$ )과 acyl migration에 의하여 생성될 수 있는 TAG 분자들(예, PSO/OPS/OSP/SPO 등)의 sn-2 위치에 존재하는 palmitic과 stearic acid 양( $Y_2, \%$ )을 Table 5에 나타내었다.  $Y_1$ (효소 합성 반응물 중 TAG-P/O/S의 합성량)의 경우 최고 37.13%(반응번호 8)에서 최소 1% 미만 (반응번호 1)으로 나타났으며, 반응시간이 길수록, 사용된 반응효소의 비율이 높을수록, 그리고 기질비율이 클수록  $Y_1$ 의 값이 커지는 경향을 나타내었다. 한편, 중심합성계획의 ANOVA 결과  $Y_1$ 에 대한 lack of fit이  $P=0.128$ 로써 모형에 적합 하였고,  $Y_1$ 에 대한  $R^2$ (coefficient of determination)값은 0.968으로 5% 이내의 유의수준에서 인정되었다.  $Y_2$ 의 경우 lack of fit이  $P=0.273$ ,  $R^2$ 값은 0.990이었다(data not shown).  $Y_1$ 과  $Y_2$ 에 대한 회귀계수는 Table 6에 나타내었고 이를 통해서 다음과 같은 반응표면 회귀식을 구하였다.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} X_i X_j$$

$$Y_1 \text{ (TAG-P/O/S, \%)} =$$

$$22.6276 + 4.99797X_1 + 8.37231X_2 + 8.00771X_3 - 1.39491X_1^2 - 5.11792X_2^2 - 1.17297X_3^2 - 0.472498X_1X_2 + 1.60489X_1X_3 + 2.82856X_2X_3$$

$$Y_2 \text{ (S/P-sn-2, \%)} =$$

$$19.8898 + 5.36433X_1 + 10.0906X_2 + 4.66936X_3 - 0.560132X_1^2 - 2.68584X_2^2 - 1.30038X_3^2 + 3.55166X_1X_2 + 1.66767X_1X_3 + 3.01584X_2X_3$$

Camellia oil과 palmitic 및 stearic ethyl ester를 기질로 sn-1,3 위치에 특이적으로 반응하는 Lipozyme TLIM으로 반응 할 때,  $Y_1$ (효소 합성반응물중 TAG-P/O/S의 합성량)은 높은 수치를 보이면서도  $Y_2$ (효소 합성반응물의 sn-2 위치에 존재하는 palmitic과 stearic acid의 양)는 낮아야 대칭형인 POS를 효율적으로 합성할 수 있다. Fig. 6에서 반응효소의 양( $X_1$ )이 높아질수록  $Y_1$ 이 증가하는 경향을 보였고, 반응시간( $X_2$ )과  $Y_1$ 의 관계는 반응초기부터 200 min 까지는  $Y_1$ 이 급격히 증가하다가 200 min 이후부터는 증가율은 떨어졌고 300 min 이후에는  $Y_1$  증가에 큰 변화가 보이지 않았다. 한편, 기질비율( $X_3$ )이 높아질수록  $Y_1$ 이 증가하는 경향을 보였다.  $Y_2$ 의 경우, 반응시간, 반응효소의 비율, 그리고 기질비율이 증가할수록 또한  $Y_2$ 도 비례적으로 증가하는 추세를 보였는데, 이는 acyl migration의 발생정도가 이들과 매우 관련이 있기 때문이다. Fig. 7A와 7B는  $Y_1$ 과  $Y_2$ 가 반응효소비율에 따른 반응

시간과 반응기질의 비율의 관계를 등고선으로 나타낸 것이며, 만일 반응효소비율이 2%에서 6%로 증가가 되어도 같은  $Y_1$ 와  $Y_2$ 의 값은 사용되는 반응기질의 비율이 적어지고, 반응시간이 짧아져도 얻을 수 있음을 보여주고 있다. 한편, Table 6에서는 독립변수( $X_1$ 과  $X_2$ ,  $X_3$ )와 종속변수  $Y_1$ 과  $Y_2$ 의 상호간의 유의성을 보여주고 있다.  $Y_1$ 에 대하여 효소양( $X_1$ ), 반응시간( $X_2$ ), 기질 몰비율( $X_3$ )이 모두 유의적으로 영향을 미치는 것으로 나타났다. 그 중에서도  $X_2$ 와  $X_3$ 가 좀더 유의적인 영향을 보였다.  $Y_2$ 에 대하여는  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$ 이 모두 유의적으로 영향을 미치는데, 그 중에서도  $X_2$ 가 가장 유의적인 것으로 나타났다. 한편, 이와 같이 얻어진 반응 표면 분석 결과를 이용하여 포화-불포화-포화 지방산을 가진 대칭형 POS를 효율적으로 합성할 수 있는 최적화 반응 조건을 예측해 보았다.  $Y_2$ 를 최소화(minimize)시키는 반응조건에서는  $Y_1$ 의 값이 매우 적어지므로  $Y_2$ 의 수치를 10%로 지정하였을 때,  $Y_1$ 을 최대화시키기 위한 예측반응조건을 반응표면분석 프로그램(Modde Softwasre, version 5.0, Umetrics)을 이용하여 분석하였다. 따라서 Modde 5.0의 optimizer를 이용하여 반응물의 생성을 최대로 하면서 acyl migration의 발생을 10%(코코아버터 대체지인 CBE의 경우에 sn-2 위치에 포화지방산이 약 10% 정도 존재하기 때문) 이내로 억제하기 위한 최적의 반응조건은 효소양( $X_1$ )= 5.9%, 반응시간( $X_2$ )= 60 min, 그리고 기질비율( $X_3$ )= 1:3(1 mole의 camellia oil: 3 mole의 palmitic ethyl ester + 3 mole의 stearic ethyl ester)이었다. 이때의 효소 합성반응물중 TAG-P/O/S의 합성량( $Y_1$ )은 18.8% 이었고 acyl migration에 의한 효소 합성반응물의 sn-2 위치에 존재하는 palmitic과 stearic acid의 양( $Y_2$ )는 10.4%로 예측되었다(data not shown). 이와 같은 예측조건에서 효소 합성반응물이 실제적으로 재합성되었고, RP-HPLC를 통한 TAG분자들의 전체 구성과 TAG-P/O/S의 양( $Y_1$ ), 그리고 sn-2 위치에 존재하는 palmitic과 stearic acid의 양을 분석하였다.

**Table 5. Three-factors and three-levels of central composite design**

Exp. No	Factors <sup>1)</sup>			Responses <sup>2)</sup>	
	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$Y_1$	$Y_2$
				Observed	Observed
1	2	60	1	0.86±0.02	3.31±0.97
2	6	60	1	4.11±0.30	5.10±0.43
3	2	360	1	8.51±1.35	11.19±1.38
4	6	360	1	16.28±0.30	23.86±1.44
5	2	60	3	3.97±0.21	4.79±1.10
6	6	60	3	20.05±1.49	9.92±0.18
7	2	360	3	29.35±2.86	21.40±2.61
8	6	360	3	37.13±0.66	44.07±2.26
9	2	210	2	13.32±1.40	13.19±0.67
10	6	210	2	28.42±0.41	24.57±0.27
11	4	60	2	6.43±0.22	5.00±1.24
12	4	360	2	27.87±0.74	28.51±0.67
13	4	210	1	11.43±1.85	13.16±0.64
14	4	210	3	30.76±0.05	23.12±1.54
15	4	210	2	23.22±0.40	20.10±1.59
16	4	210	2	21.77±0.03	19.73±0.54
17	4	210	2	24.34±0.96	21.65±2.42

<sup>1</sup>)X<sub>1</sub>= enzyme amount (2, 4, 6 %), X<sub>2</sub>= reaction time (60, 120, 360 min), X<sub>3</sub>= substrate molar ratio of camellia oil to stearic and palmitic ethyl ester (1:1, 1:2, 1:3 mol:mol). See Table 1.

<sup>2</sup>)Y<sub>1</sub>= TAG-P/O/S (TAG % containing each one mole of palmitic, stearic and oleic moiety at any sn-position; i.e. POS and PSO/OSP/OPS/SPO would be produced through acyl migration).

Y<sub>2</sub>= P/S-sn-2 (Fatty acid % of palmitic and stearic acid at sn-2 position of TAG).

**Table 6. Regression coefficients and significance of the second-order polynomials for Y<sub>1</sub> and Y<sub>2</sub>**

Variables <sup>1)</sup>	Y <sub>1</sub> <sup>2)</sup>		Y <sub>2</sub> <sup>3)</sup>	
	Coefficient (β)	P value	Coefficient (β)	P value
Intercept	22.6276	4.493×10 <sup>-7</sup>	19.8898	1.352×10 <sup>-8</sup>
X <sub>1</sub>	4.99797	1.128×10 <sup>-3</sup>	5.36433	1.338×10 <sup>-5</sup>
X <sub>2</sub>	8.37232	4.680×10 <sup>-5</sup>	10.0906	1.830×10 <sup>-7</sup>
X <sub>3</sub>	8.00771	6.243×10 <sup>-5</sup>	4.66936	3.341×10 <sup>-5</sup>
X <sub>1</sub> X <sub>1</sub>	-1.39491	4.692×10 <sup>-1</sup>	-0.560132	5.800×10 <sup>-1</sup>
X <sub>2</sub> X <sub>2</sub>	-5.11792	2.625×10 <sup>-2</sup>	-2.68584	2.722×10 <sup>-2</sup>
X <sub>3</sub> X <sub>3</sub>	-1.17297	5.405×10 <sup>-1</sup>	-1.30038	2.200×10 <sup>-1</sup>
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	-0.472498	6.678×10 <sup>-1</sup>	3.55166	3.827×10 <sup>-4</sup>
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	1.60489	1.720×10 <sup>-1</sup>	1.66767	2.038×10 <sup>-2</sup>
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	2.82856	3.149×10 <sup>-2</sup>	3.01584	1.011×10 <sup>-3</sup>

<sup>1</sup>)X<sub>1</sub>= enzyme amount (2, 4, 6%), X<sub>2</sub>= reaction time (60, 120, 360 min), X<sub>3</sub>= substrate molar ratio of camellia oil to stearic and palmitic ethyl ester (1:1, 1:2, 1:3 mol:mol). See Table 1.

<sup>2</sup>)Y<sub>1</sub>= TAG-P/O/S (TAG% containing each one mole of palmitic, stearic and oleic moiety at any sn-position; i.e. POS and PSO/OSP/OPS/SPO would be produced through acyl migration).

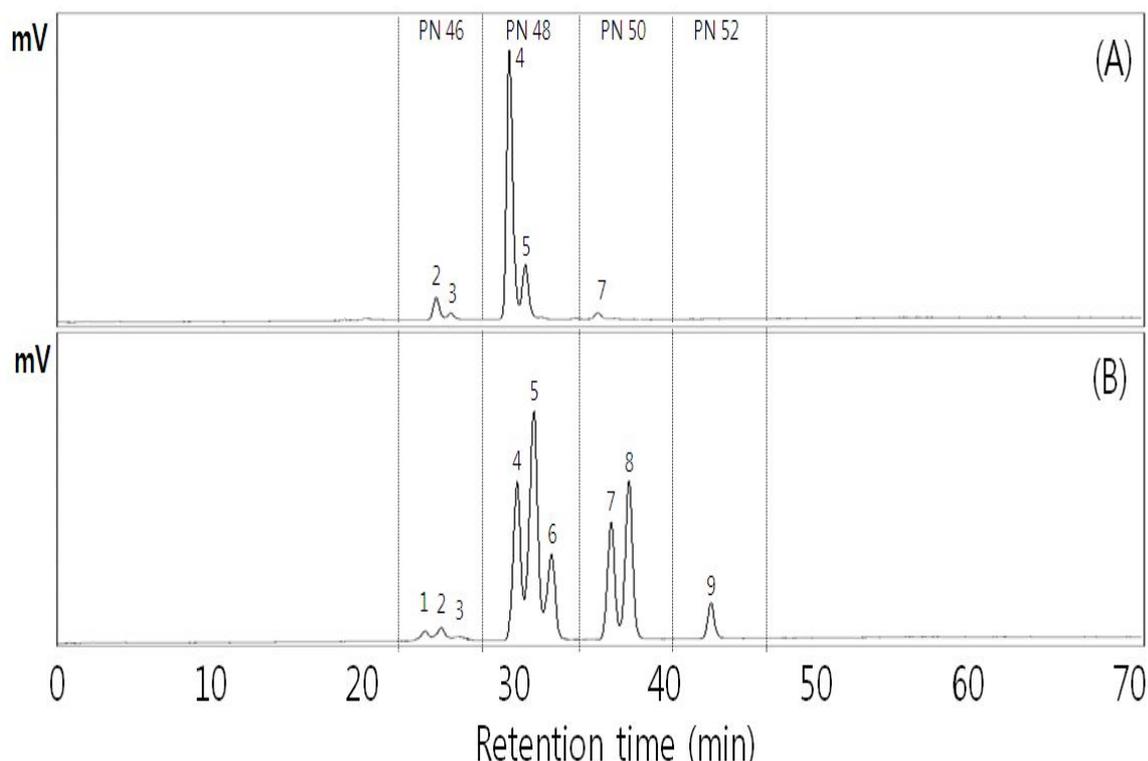
<sup>3</sup>)Y<sub>2</sub>= P/S-sn-2 (Fatty acid% of palmitic and stearic acid at sn-2 position of TAG).

### (3) Reversed-phase HPLC와 지방산 분석

Figure 6는 최적화 하여 얻어진 반응조건인 효소양(X<sub>1</sub>)= 5.9%, 반응시간(X<sub>2</sub>)= 60 min, 그리고 기질비율(X<sub>3</sub>)= 1:3에서 합성된 반응물을 reversed-phase HPLC 로 분석한 결과를 나타낸 그림이다. 비교를 위해 기질로 사용된 camellia oil도 함께 분석을 하였다. Camellia oil의 주요 TAG 조성은 POL/PLO, PLP/SLP, OOO, POO, SOO 등인데 비하여, 합성된 반응물은 LOO, POL/PLO, PLP/SLP, OOO, POO, POP/PPO, SOO, POS/PSO(i.e.

TAG-P/O/S), SOS/SSO(P= palmitic acid O= oleic acid, S= stearic acid, L= linoleic acid)로 이루어져 있었다. Table 7는 camellia oil과 최적 반응 조건에서 얻어진 효소 합성반응물의 TAG를 area %로 나타내고 있다. Camellia oil은 POL/PLO(6.27%), PLP/SLP(1.79%), OOO(74.59%), POO(15.47%), SOO(1.88%)이고, 효소 합성반응물은 LOO(0.94%), POL/PLO(1.83%), PLP/SLP(0.54%), OOO(%14.24), POO(31.66%), POP/PPO(12.24%), SOO(13.88%), POS/PSO(i.e. TAG-P/O/S, 21.07%), SOS/SSO(3.59%)로 구성되어 있었다. Camellia oil의 경우 PN=48의 TAG들이 90% 함량을 보였으며 효소 합성반응물은 PN=48과 PN=50에서 90%이상 함량을 보였다. 반응 표면 분석에 의한 최적화 조건에서 얻어진 효소 합성반응물의 지방산 조성을 분석하여 Table 8과 같이 나타내었다. 효소 합성반응물의 주요지방산은 oleic acid(C18:1, 54.56%)이었고, palmitic acid(C16:0, 23.29%), stearic acid(C18:0, 17.66), linoleic acid(C18:2, 4.49%)가 존재하였다. Sn-2 위치에서의 지방산 조성에서도 oleic acid(C18:1, 80.42%)로 제일 많이 나타났고, palmitic acid(C16:0, 7.70%), stearic acid(C18:0, 5.01%), linoleic acid(C18:2, 6.86%) 순으로 나타났으며, sn-1,3 위치에서의 지방산조성에서는 oleic acid(C18:1, 41.64%)와 palmitic acid(C16:0, 31.08%) 그리고 stearic acid(C18:0, 23.97%)가 주를 이루었고 소량의 linoleic acid(C18:2, 3.31%)가 나타났다.

한편, 중심 합성 계획에 의한 반응 표면 분석을 통해 얻어진 POS를 효율적으로 합성할 수 있는 최적화 조건은 반응조건은 효소양( $X_1$ )= 5.9%, 반응시간( $X_2$ )= 60 min, 그리고 기질 비율( $X_3$ )= 1:3(1 mole의 camellia oil: 3 mole의 palmitic ethyl ester + 3 mole의 stearic ethyl ester)이었고, 이에 따라 합성된 반응물의 TAG-P/O/S(palmitic, stearic과 oleic 지방산을 각각 1 분자씩 어느 위치이던지 함유한 TAG, 즉 POS 및 PSO/OSP/OPS/SPO)의 합성율은 20.19% 이었으며, 예측치인 18.8%와 1.3%의 차이를 보였다. 이때 acyl migration등에 의하여 sn-2 위치에 결합(이동)한 palmitic과 stearic acid의 양(P/S-sn-2)은 12.71%로써 예측치인 10.4%와 2.31%차이를 보였으며, 예측모델에서 얻어진 결과값과 유사하였다.



**Fig. 6.** Chromatograms of the reversed-phase HPLC (A) camellia oil and (B) product containing 1(3)-palmitoyl-3(1)-stearoyl-2-oleoyl glycerol (POS) which was obtained from the interesterification with camellia oil, palmitic ethyl ester, and stearic ethyl ester. The reaction conditions; substrate molar ratio = 1:3 (1 mole of camellia oil: 3 mole of palmitic ethyl ester + 3 mole of stearic ethyl ester), reaction time = 60 min, and enzyme amount = 5.9%. Peak number is explained in Table 7.

**Table 7.** Triacylglycerol compositions (area%) of camellia oil and the reaction product

Peak number <sup>1)</sup>	PN <sup>2)</sup>	Compounds <sup>3)</sup>	Camellia oil	Reaction product <sup>4)</sup>
1	46	LOO	-	0.94
2	46	POL/PLO	6.27	1.83
3	46	PLP/SLP	1.79	0.54
4	48	OOO	74.59	14.24
5	48	POO	15.47	31.66
6	48	POP/PPO	-	12.24
7	50	SOO	1.88	13.88
8	50	POS/PSO	-	21.07
9	52	SOS/SSO	-	3.59

<sup>1)</sup>Peak numbers are from the Fig. 6.

<sup>2)</sup>PN: partition number that was described in material and methods.

<sup>3)</sup>TAG containing acyl moiety in which P = palmitic acid, O = oleic acid, S = stearic acid, L = linoleic acid.

<sup>4)</sup>Product containing POS which was obtained from the interesterification with camellia oil, palmitic ethyl ester, and stearic ethyl ester. The reaction conditions; substrate molar ratio = 1:3 (1 mole of camellia oil: 3 mole of palmitic ethyl ester + 3 mole of stearic ethyl ester), reaction time = 60 min, and enzyme amount = 5.9%.

**Table 8. Composition of total and positional fatty acid (sn-2 and sn-1,3 positions) in the reaction product<sup>1)</sup>**

Fatty acid(area %)	Total	sn-2 position	sn-1,3 position
C16:0	23.29±1.53	7.70±1.10	31.08±2.61
C18:0	17.66±0.60	5.01±0.11	23.97±0.88
C18:1	54.56±1.57	80.42±1.16	41.64±2.71
C18:2	4.49±0.29	6.86±0.34	3.31±0.31
ΣUSFA <sup>2)</sup>	59.05±0.99	87.29±0.67	44.95±1.62
ΣSFA <sup>3)</sup>	40.95±0.99	12.71±0.67	55.05±1.62

<sup>1)</sup>Product containing POS which was obtained from the interesterification with camellia oil, palmitic ethyl ester, and stearic ethyl ester. The reaction conditions; substrate molar ratio = 1:3 (1 mole of camellia oil: 3 mole of palmitic ethyl ester + 3 mole of stearic ethyl ester), reaction time = 60 min, and enzyme amount = 5.9%.

<sup>2)</sup>The sum of total unsaturated fatty acid

<sup>3)</sup>The sum of total saturated fatty acid

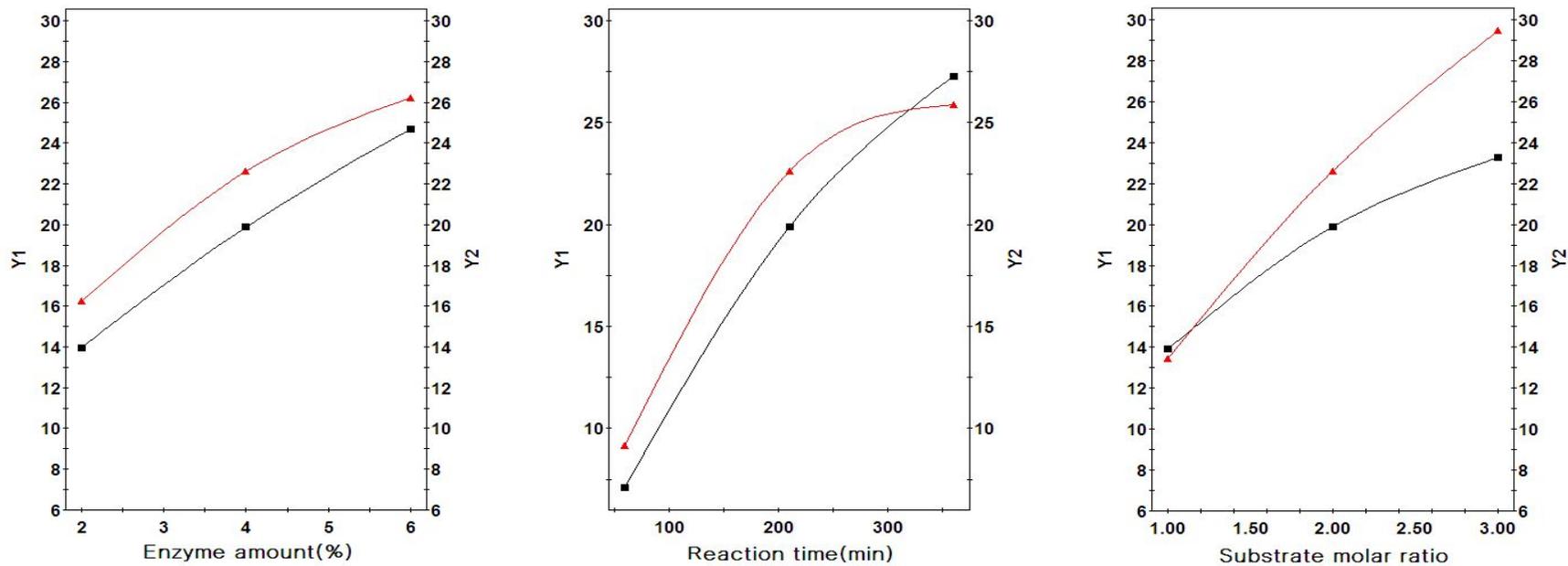
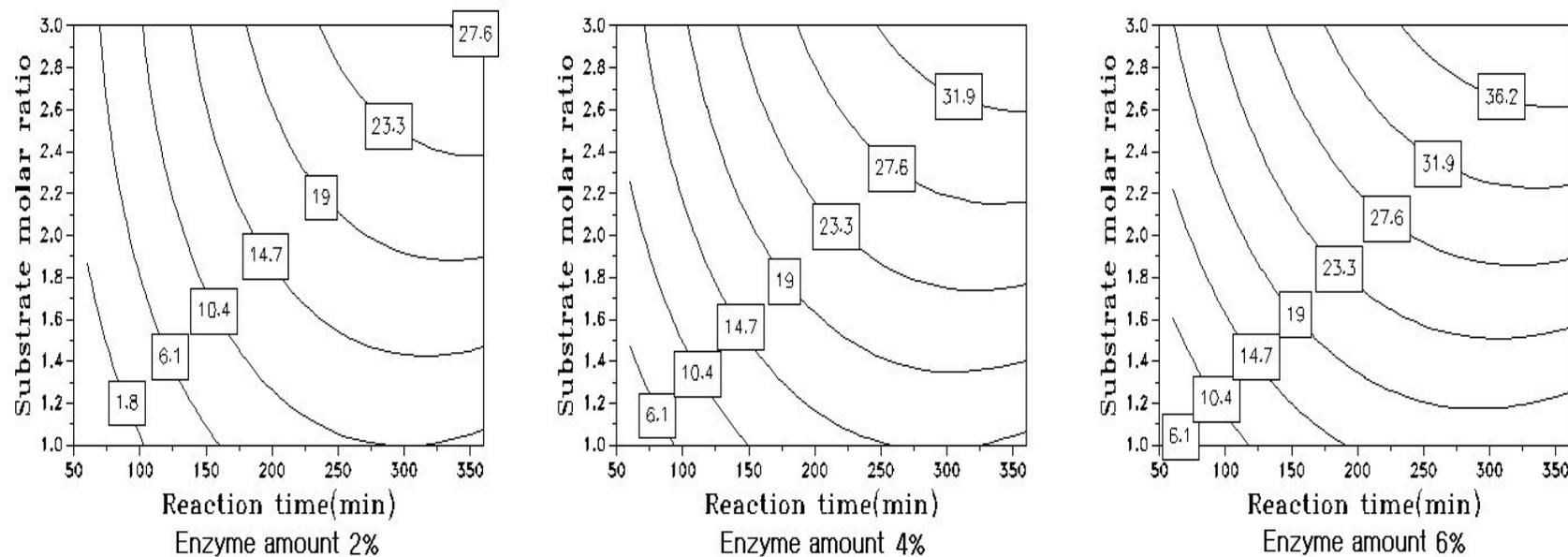


Fig. 6. Prediction plot  $Y_1$  and  $Y_2$  ( $\blacktriangle Y_1$ ,  $\blacksquare Y_2$ ).  $Y_1$  = TAG (%) containing each one mole of palmitic, stearic and oleic moiety at any sn-position.  $Y_2$  = Fatty acid (%) of palmitic and stearic acid at sn-2 position of TAG.



**Fig. 7(A).** Response contour plots for  $Y_1$  at different enzyme amounts (2, 4, and 6%).  $Y_1$  = TAG (%) containing each one mole of palmitic, stearic and oleic moiety at any sn-position.

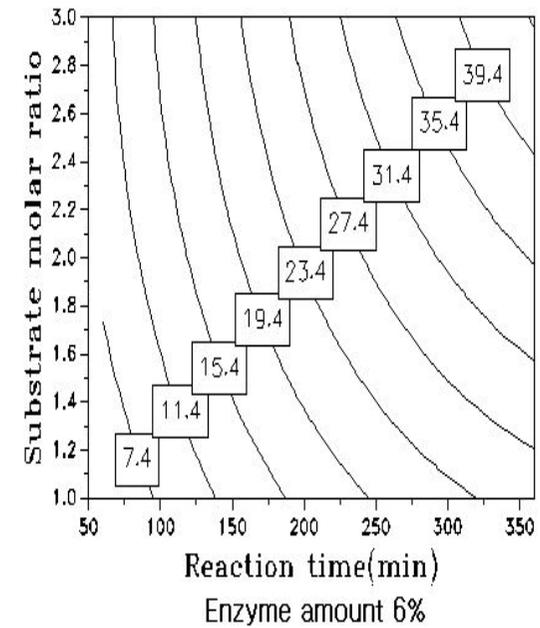
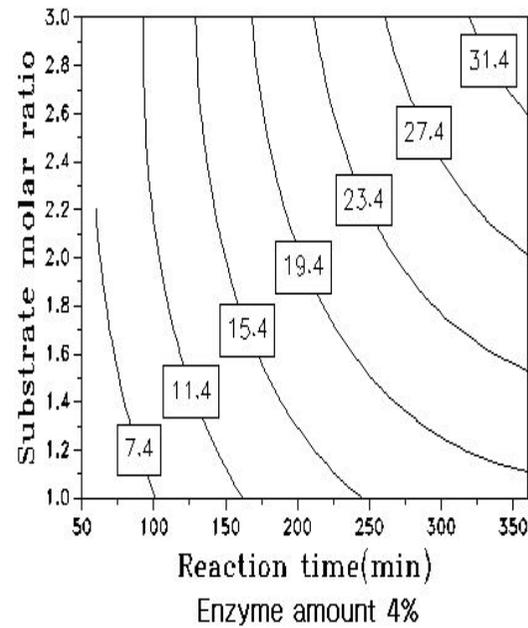
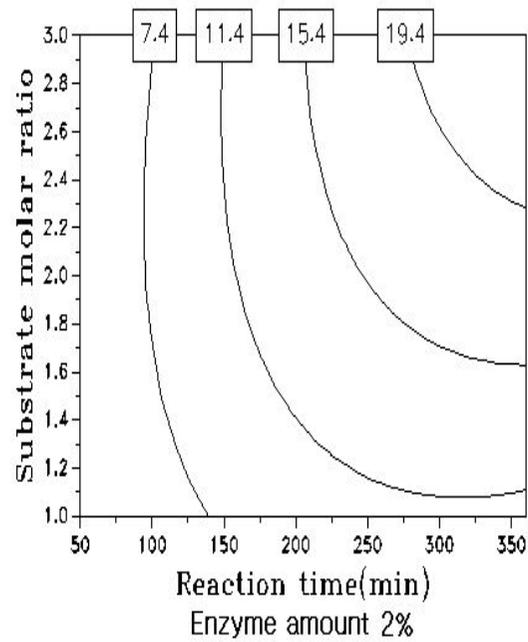


Fig. 7(B). Response contour plots for  $Y_2$  at different enzyme amounts (2, 4, and 6%).  $Y_2$  = Fatty acid (%) of palmitic and stearic acid at sn-2 position of TAG.

## 2. 팔미트산/스테아린산 에틸에스테르(Palmitic/Stearic ethylester) 대량합성 및 정제법 확립(제1협동과제)

### 가. 팔미트산 에틸 에스테르의 대량합성

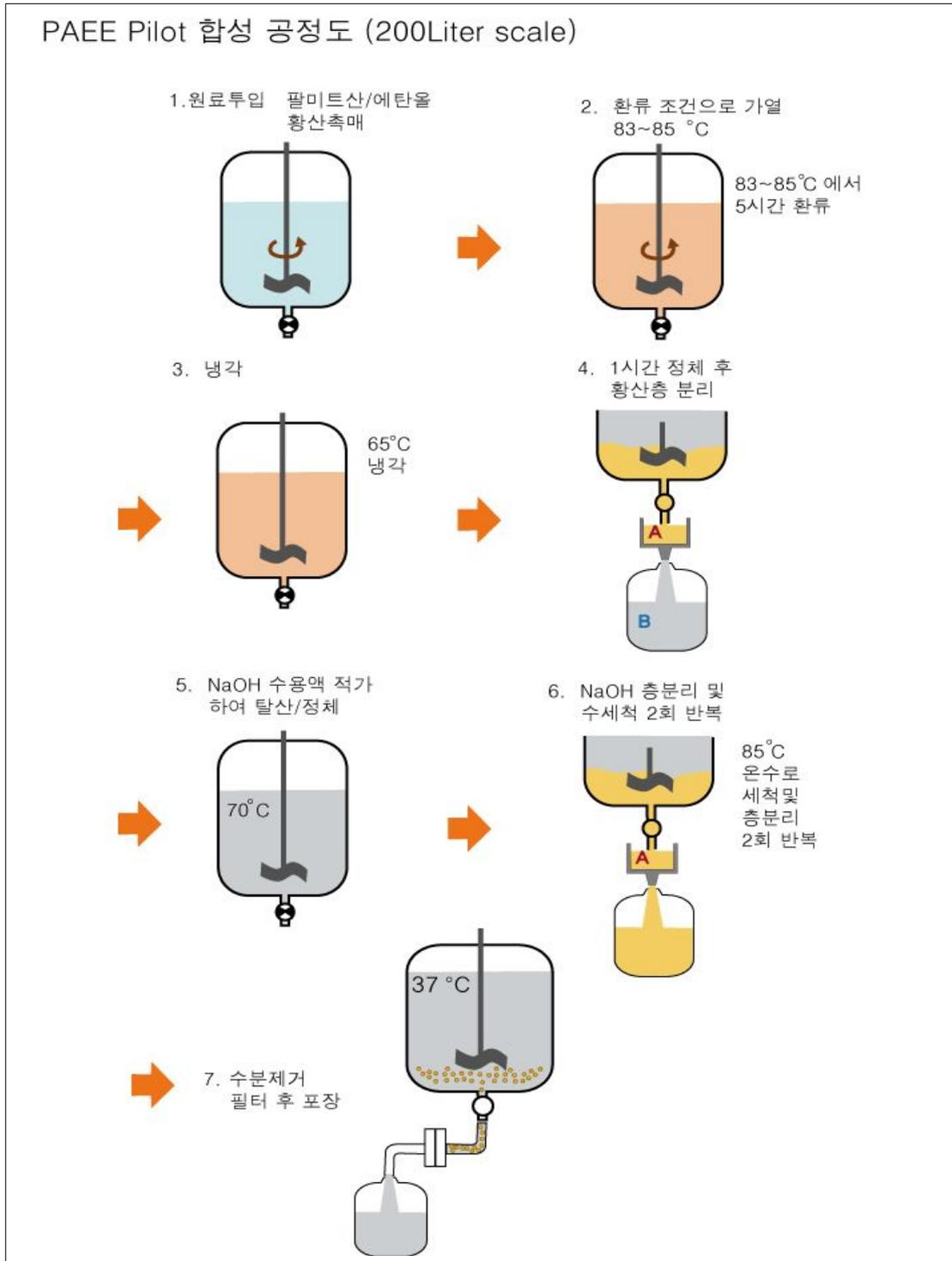
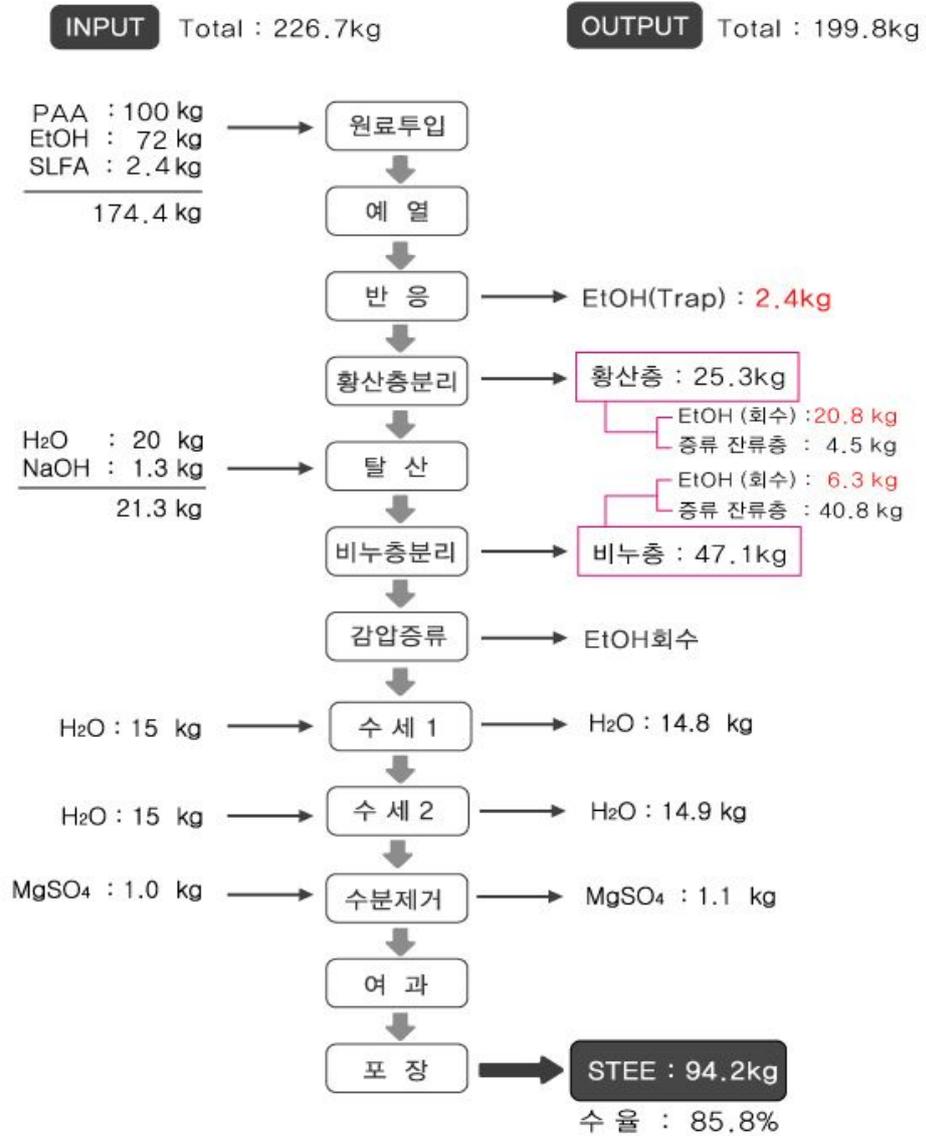


그림 8. 팔미트산 스케일업 합성 공정

CBE 합성을 위한 중요한 중간체인 팔미트산 에틸에스테르의 합성을 200 L 급 Pilot 반

용기에서 실시하였다. 그 공정은 그림 8과 같다. 200 L 급 반응기에 에틸알코올 40 kg을 먼저 부어 40℃로 온도를 설정한다. 에탄올의 온도가 40℃가 되면 분말의 팔미트산(Palmitic acid)을 100 kg을 교반기를 회전시키면서 서서히 투입한다. 팔미트산의 투입이 완료되면 나머지 30 kg의 에틸알코올을 투입한다. 에탄올의 비점보다 약간 높은 83~85℃ 조건에서 에탄올이 환류되기 시작하면 촉매인 진한 황산 2.4 kg 약 10분 동안 첨가한다. 환류조건에서 5시간 반응 후 온도를 65℃로 설정하여 냉각시킨 다음 교반기를 정지시키고 1시간 정도 정체시킨다. 정체 1시간 후에는 오일 층과 황산과 에탄올이 포함된 하층(수층)이 분리됨을 눈으로 확인하고 하층을 제거한다. 오일 층의 5 g을 샘플링하여 산가를 측정하고 NaOH 수용액을 만들어 당량만큼 가하여 유리지방산을 제거하는 탈산과정을 실시한다. 이때 약 1~2 kg의 NaOH가 사용된다. 탈산은 약 72℃에서 천천히 교반하면서 NaOH 수용액을 적가한다. 적가가 끝나면 교반을 정지시키고 정체한다. 정체 1시간 후 황산 촉매 제거와 마찬가지로 비누층(하층)을 제거한다. 비누 층의 제거가 완료되면 오일 층을 교반하면서 2차에 걸쳐 85℃의 물 15 kg을 서서히 가한 후 정체시켜 하층의 잔류 비누와 NaOH를 제거한다. 끝으로 미량의 수분을 제거하기 위해 황산마그네슘 분말 1 kg을 가한 후 여과하여 최종의 팔미트산 에틸 에스테르 94.2 kg(수율 85.8%)을 합성하였다. 본 공정의 순서는 그림 9에 요약하였다.

# PAEE PILOT 제조 결과



PAA : Palmitic Acid (256g/mol)  
EtOH : Ethanol (46g/mol)  
SLFA : Sulfric acid  
PAEE : Stearic acid Ethyl Ester(284g/mol)

그림 9. 팔미트산 에틸에스테르 합성 공정도

나. 스테아린산 에틸 에스테르의 대량합성

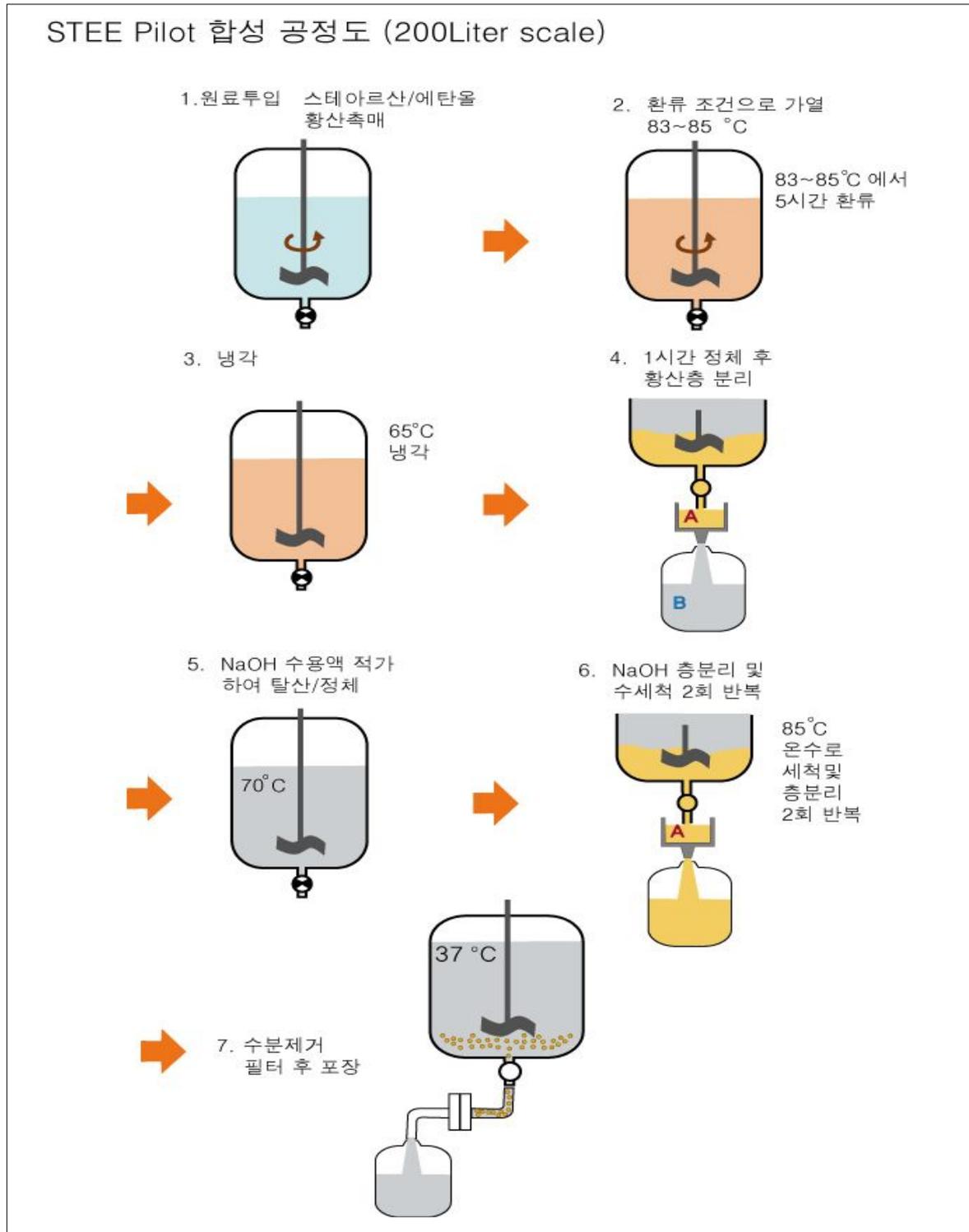


그림 10. 스테아린산 에틸 에스테르 합성 공정

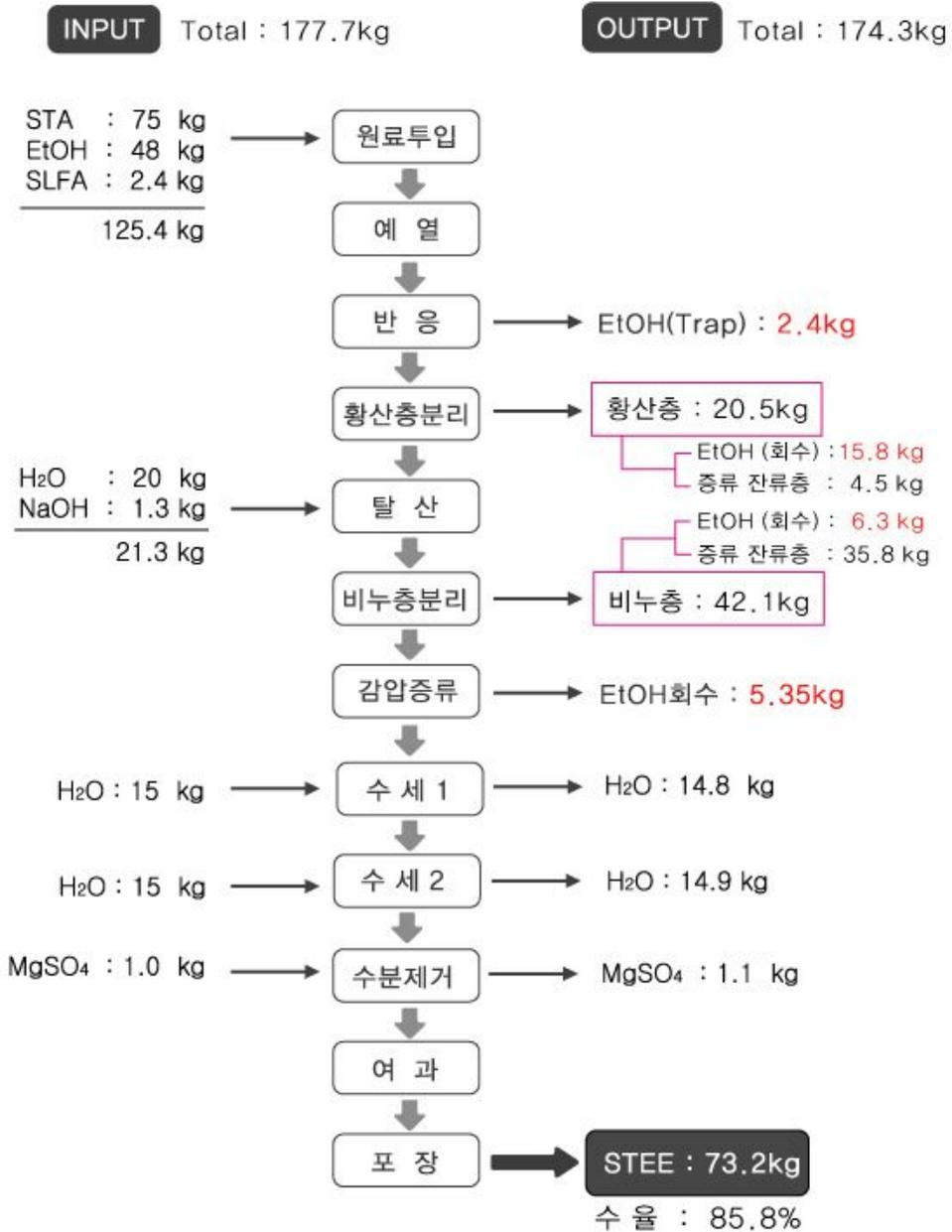
CBE 합성을 위한 또 하나의 중요한 중간체인 스테아린산 에틸 에스테르의 합성을 200 L 급 Pilot 반응기에서 실시하였다. 그 공정은 그림 10과 같다. 200 L 급 반응기에 에틸알코올

30 kg을 먼저 부어 40℃로 온도를 설정한다. 에탄올의 온도가 40℃에 다다르면 분말의 스테아린산(Palmitic acid)을 75 kg을 교반기를 가동시키면서 서서히 투입한다. 스테아린산의 투입이 완료되면 나머지 18 kg의 에틸알코올을 투입한다. 에탄올의 비점보다 약간 높은 83~85℃조건에서 에탄올이 환류되기 시작하면 촉매인 진한 황산 2.4 kg 약 10분 동안 첨가한다. 환류조건에서 5시간 반응 후 온도를 65℃로 설정하여 냉각시킨 다음 교반기를 정지시키고 1시간 정도 정체시킨다. 정체 1시간 후에는 오일 층과 황산과 에탄올이 포함된 하층(수층)이 분리됨을 눈으로 확인하고 하층을 제거한다. 오일 층의 5 g을 샘플링하여 산가를 측정하고 NaOH 수용액을 만들어 당량만큼 가하여 유리지방산을 제거하는 탈산과정을 실시한다. 이때 약 1~2 kg의 NaOH가 사용된다. 탈산은 약 72℃에서 천천히 교반하면서 NaOH 수용액을 적가한다. 적가가 끝나면 교반을 정지시키고 정체한다. 정체 1시간 후 황산 촉매 제거와 마찬가지로 비누층(하층)을 제거한다. 비누 층의 제거가 완료되면 오일 층을 교반하면서 2차에 걸쳐 85℃의 물 15 kg을 서서히 가한 후 정체시켜 하층의 잔류 비누와 NaOH를 제거한다. 끝으로 미량의 수분을 제거하기 위해 황산마그네슘 분말 1 kg을 가한 후 여과하여 최종의 스테아린산 에틸 에스테르 73.2 kg(수율 85.8%)을 합성하였다. 본 공정의 제조결과는 그림 12에 요약하였고 수행 장치는 그림 11과 같다.



그림 11. 지방산 에틸 에스테르 합성장치(한국화학연구원)

# STEE PILOT 제조 결과



STA : Stearic Acid (284g/mol)  
EtOH : Ethanol (46g/mol)  
SLFA : Sulfric acid  
STEE : Stearic acid Ethyl Ester(312g/mol)

그림 12. 스테아린산 에틸에스테르 합성 공정도

## 제 2 절. 효소적 공법에 의한 POS/SOS 합성 최적화 조건 확립(연속식) 및 산업화를 위한 대량 합성 및 정제법 확립

### 1. 효소적 공법에 의한 POS/SOS 합성 최적화 조건 확립 (연속식) (제1세부과제)

가. 연속식 반응기(packed-bed reactor)를 이용한 코코아버터 유사지의 효소적 합성 연구

카놀라유와 palmitic ethyl ester(PEE) 및 stearic ethyl ester(StEE)를 기질로 사용하여 Lipozyme TLIM 효소가 충전되어 있는 연속식반응기에서 코코아버터 유사지를 합성하였다. 연속식 반응기는 이중자켓으로 되어있어 항온수조에 의해 50℃로 유지하여 반응하였다.

#### (1) 연속식 반응기에서 합성한 반응물의 triacylglycerol 조성

Lipozyme TLIM 으로 각각 100 g, 125 g, 150 g으로 충전되어 연속식 반응기에서 카놀라유(Ca)와 palmitic ethyl ester(PEE), stearic ethyl ester(StEE)를 기질 몰비율(Ca:PEE:StEE, 1:2:2, 1:2:4, 1:2:6, 1:3:6)별로 반응하였다. 이때 각 기질의 유량은 8 g/min과 13 g/min으로 설정하여 반응 정도를 reversed-phase HPLC 분석을 수행하여 살펴보았다. TAG의 조성은 retention time(RT)와 equivalent carbon number(ECN)사이의 다음 관계식을 통하여 분석하였다. 아래식에서 ECN은 TAG의 glycerol의 세 탄소수를 제외한 지방산들의 전체 탄소수(CN)를 나타내며, DN는 총 이중결합의 수를 나타내었다.

$$\text{Equivalent carbon number (ECN)} = \text{total number of carbons (CN)} - 2 \times \text{total number of double bonds (DN)}$$

카놀라유(Ca)와 palmitic ethyl ester(PEE), stearic ethyl ester(StEE)의 기질 몰비율을 1:2:2(w/w/w)로 하여 Lipozyme TLIM의 양(100 g, 125 g, 150 g)과 기질유량(8 g/min, 13 g/min)에 따른 TAG 조성을 Table 9에 나타내었다. 카놀라유의 주요 지방산은 oleic acid(대략 65%)으로 triolein(OOO, ECN 48)의 함량이 42 area%이었다. 1:2:2의 기질 유량이 8 g/min 일때, Lipozyme TLIM 효소가 충전된 연속식 반응기에서 TLIM 150 g으로 반응 하였을 때 OOO의 함량은 3.39%이었으며, TLIM 125 g으로 반응 하였을 때 OOO의 함량은 5.38%이었으며, TLIM 100 g으로 반응 하였을 때 OOO의 함량이 7.62%이었다(Table 9). 또한, 1:2:2의 기질 유량이 13 g/min일때, TLIM 150 g에서는 OOO의 함량이 8.28%이었으며, TLIM 125 g와 TLIM 100 g으로 반응 하였을 때 OOO의 함량은 각각 10.92와 14.84%이었다. 반응물에서 OOO의 함량이 낮을수록 PEE/StEE와의 반응이 더 진행되었음을 알 수 있었다. 따라서 카놀라유로부터 유래된 OOO의 area%가 각 효소별로 유량이 낮을수록 감소하는 경향을 나타내었다. 반응물에서의 POP/POS/SOS의 생성률을 살펴보면, 1:2:2의 기질 유량이 8 g/min 일때 TLIM 150 g에서는 POP 13.82%, POS 19.32%, SOS 5.05% 이었으며, TLIM 125 g에서는 POP 11.36%, POS 15.65%, SOS 3.70%, TLIM 100 g에서는 POP

8.21%, POS 10.76%, SOS 3.90% 이었다. 연속식 반응기에서 증진되어 있는 효소의 양이 높을수록 생성되는 POP/POS/SOS의 함량이 높아지는 경향을 나타내었다. 1:2:2의 기질 유량이 13 g/min 일때 TLIM 150 g에서는 POP 8.27%, POS 11.43%, SOS 2.99% 이었으며, TLIM 125 g에서는 POP 7.25%, POS 9.27%, SOS 2.47%, TLIM 100 g에서는 POP 4.37%, POS 6.78%, SOS 1.67% 이었다.

Table 9. Triacylglycerol species and equivalent carbon number (ECN) of structured lipids synthesized with substrate molar ratio of 1:2:2 (Ca:PEE:StEE, w/w/w).

ECN	TAG species	TL IM, 150 g		TL IM, 125 g		TL IM, 100 g	
		8 g/min	13 g/min	8 g/min	13 g/min	8 g/min	13 g/min
46	LOO	2.99±0.38	6.54±0.14	4.34±0.20	7.88±0.53	7.33±1.00	11.08±0.39
	LOP	11.61±1.33	13.65±0.42	12.28±0.18	13.38±0.03	14.95±1.65	12.45±0.76
	PLP/SLP	3.88±0.76	2.09±0.19	2.91±0.16	2.30±0.14	3.05±0.23	1.13±0.16
48	OOO	3.39±0.41	8.28±0.18	5.38±0.81	10.92±1.16	7.62±0.35	14.84±0.23
	POO	21.56±0.64	28.02±0.00	26.42±0.16	28.15±0.35	26.72±0.82	28.02±0.90
	POP	13.82±0.59	8.27±0.59	11.36±0.63	7.25±0.06	8.21±0.18	4.37±0.28
50	SOO	10.35±0.92	14.27±0.04	12.23±0.10	12.34±0.37	11.43±0.56	12.81±1.00
	POS	19.32±1.15	11.43±0.34	15.65±0.78	9.27±0.76	10.76±1.05	6.78±0.32
	PPS	1.34±0.23	0.31±0.05	0.47±0.05	0.30±0.0	-	-
52	SOS	5.05±0.35	2.99±0.44	3.70±0.29	2.47±0.04	3.90±1.68	1.67±0.28
	SSP	1.16±0.06	-	0.62±0.03	0.20±0.0	0.31±0.0	-
54	SSS	0.45±0.36	-	-	-	-	-

Structured lipids were synthesized at two flow rates(8 and 13 g/min) in a packed-bed reactor with different Lipozyme TL IM amounts (150 g, 125 g and 100 g), respectively. Abbreviation in TAG species: L: linoleic acid; O: oleic acid; P: palmitic acid; S: stearic acid.

카놀라유(Ca)와 PEE, StEE의 기질 몰비율을 1:2:4(w/w/w)로 하여 Lipozyme TLIM의 양(100 g, 125 g, 150 g)과 기질유량(8 g/min, 13 g/min)에 따른 TAG 조성을 Table 10에 나타내었다. 1:2:4의 기질 유량이 8 g/min 일때, Lipozyme TLIM 효소가 증진된 연속식 반응기에서 TLIM 150 g으로 반응 하였을 때 OOO의 함량은 0.72%이였으며, TLIM 125 g으로 반응 하였을 때 OOO의 함량은 1.36%이였으며, TLIM 100 g으로 반응 하였을 때 OOO의 함량은 3.63%이였다(Table 10). 또한, 1:2:4의 기질 유량이 13 g/min일때, TLIM 150 g에서는 OOO의 함량이 3.19%이였으며, TLIM 125 g와 TLIM 100 g에서는 OOO의 함량이 각각 4.77와 10.03%이였다. 카놀라유로부터 유래된 OOO의 area%는 각 효소별로 유량이 낮을수록 감소하는 경향을 나타내었다. 반응물에서의 POP/POS/SOS의 생성률을 살펴보면, 1:2:4의 기질 유량이 8 g/min 일때 TLIM 150 g에서는 POP 11.09%, POS 27.94%, SOS 18.65% 이였으며, TLIM 125 g에서는 POP 10.97%, POS 26.06%, SOS 17.49%, TLIM 100 g에서는 POP 8.76%, POS 18.46%, SOS 10.10% 이였다. 효소의 양이 높을수록 생성되는

POP/POS/SOS의 함량이 높아지는 경향을 나타내었다. 1:2:4의 기질 유량이 13 g/min 일때 TLIM 150 g에서는 POP 9.64%, POS 20.65%, SOS 11.75% 이었으며, TLIM 125 g에서는 POP 8.45%, POS 17.95%, SOS 10.63%, TLIM 100 g에서는 POP 5.16%, POS 12.65%, SOS 7.12% 이었다.

Table 10. Triacylglycerol species and equivalent carbon number (ECN) of structured lipids synthesized with substrate molar ratio of 1:2:4 (Ca:PEE:StEE, w/w/w).

ECN	TAG species	TL IM, 150 g		TL IM, 125 g		TL IM, 100 g	
		8 g/min	13 g/min	8 g/min	13 g/min	8 g/min	13 g/min
46	LOO	0.80±0.0	2.02±0.52	1.01±0.28	3.47±0.05	3.40±0.05	6.04±0.01
	LOP	5.35±0.07	7.88±1.36	6.53±0.11	9.05±0.22	10.22±0.52	8.85±0.16
	PLP/SLP	2.19±0.01	1.48±0.31	2.22±0.26	1.81±0.27	1.75±0.21	0.96±0.11
48	OOO	0.72±0.17	3.19±0.24	1.36±0.08	4.77±0.66	3.63±0.35	10.03±0.29
	POO	12.50±0.56	21.47±1.48	15.19±0.41	21.54±0.09	23.49±1.36	25.10±0.09
	POP	11.09±0.41	9.64±0.08	10.97±0.10	8.45±0.08	8.76±0.05	5.16±0.05
50	SOO	11.21±0.56	19.10±0.42	13.38±0.67	18.05±0.07	16.67±0.78	19.88±0.58
	POS	27.94±0.23	20.65±0.67	26.06±0.06	17.95±0.21	18.46±0.01	12.65±0.67
	PPS	1.35±0.22	0.42±0.0	0.79±0.12	0.29±0.02	-	-
52	SOS	18.65±0.35	11.75±0.03	17.49±0.44	10.63±0.18	10.10±0.45	7.12±0.08
	SSP	4.81±0.01	1.08±0.05	2.82±0.40	0.94±0.23	0.55±0.10	0.33±0.0
54	SSS	2.30±0.0	0.56±0.0	1.40±0.29	0.41±0.01	-	-

Structured lipids were synthesized at two flow rates (8 and 13 g/min) in a packed-bed reactor with different Lipozyme TL IM amounts (150 g, 125 g and 100 g), respectively. Abbreviation in TAG species: L: linoleic acid; O: oleic acid; P: palmitic acid; S: stearic acid.

카놀라유(Ca)와 PEE, StEE의 기질 몰비율을 1:2:6(w/w/w)로 하여 Lipozyme TLIM의 양 (100 g, 125 g, 150 g)과 기질유량(8 g/min, 13 g/min)에 따른 TAG 조성을 Table 11에 나타내었다. 1:2:6의 기질 유량이 8 g/min 일때, Lipozyme TLIM 150 g으로 반응 하였을 때에는 OOO가 검출되지 않았으며, TLIM 125 g와 TLIM 100 g으로 반응 하였을 때 OOO의 함량은 각각 0.54%와 1.83%이었다(Table 11). 또한, 1:2:6의 기질 유량이 13 g/min일때, TLIM 150 g에서는 OOO의 함량이 1.19%이었으며, TLIM 125 g와 TLIM 100 g일때 OOO의 함량은 각각 2.33%와 3.62%이었다.

반응물에서의 POP/POS/SOS의 생성률을 살펴보면, 1:2:6의 기질 유량이 8 g/min 일때 TLIM 150 g에서는 POP 9.13%, POS 26.76%, SOS 30.28% 이었으며, TLIM 125 g에서는 POP 10.56%, POS 27.99%, SOS 26.02%, TLIM 100 g에서는 POP 8.99%, POS 24.20%, SOS 20.96% 이었다. 효소의 양이 높을수록 생성되는 POP/POS/SOS의 함량이 높아지는 경향을 나타내었다. 1:2:6의 기질 유량이 13 g/min 일때 TLIM 150 g에서는 POP 9.89%, POS 23.38%, SOS 23.43% 이었으며, TLIM 125 g에서는 POP 7.98%, POS 21.14%, SOS 20.66%,

TLIM 100 g에서는 POP 6.97%, POS 14.13%, SOS 12.39% 이었다.

Table 11. Triacylglycerol species and equivalent carbon number (ECN) of structured lipids synthesized with substrate molar ratio of 1:2:6 (Ca:PEE:StEE, w/w/w).

ECN	TAG species	TL IM, 150 g		TL IM, 125 g		TL IM, 100 g	
		8 g/min	13 g/min	8 g/min	13 g/min	8 g/min	13 g/min
46	LOO	0.16±0.0	0.94±0.16	0.39±0.12	1.61±0.01	1.19±0.26	4.74±0.13
	LOP	2.14±0.19	5.65±1.32	3.61±0.58	6.29±0.27	5.12±0.52	10.67±0.72
	PLP/SLP	1.29±0.12	1.41±0.03	1.55±0.21	1.57±0.19	1.28±0.66	1.48±0.16
48	OOO	-	1.19±0.36	0.54±0.19	2.33±0.32	1.83±0.46	3.62±0.28
	POO	5.60±1.12	14.49±3.97	9.81±0.29	16.18±0.95	15.67±0.21	23.58±0.10
	POP	9.13±0.60	9.89±1.66	10.56±0.48	7.98±0.67	8.99±0.37	6.97±0.49
50	SOO	6.82±0.45	15.00±1.75	10.63±0.04	17.80±0.43	16.66±1.65	17.13±1.73
	POS	26.76±0.34	23.38±4.28	27.99±0.73	21.14±0.93	24.20±1.17	14.13±0.09
	PPS	1.32±0.03	0.40±0.0	0.83±0.11	0.27±0.05	0.50±0.22	-
52	SOS	30.28±1.87	23.43±0.57	26.02±1.25	20.66±1.20	20.96±0.87	12.39±0.57
	SSP	8.09±0.59	2.05±0.50	4.42±0.45	1.65±0.21	1.73±0.05	0.59±0.14
54	SSS	8.34±0.08	2.19±0.29	3.46±0.23	1.50±0.15	1.60±0.19	0.52±0.14

Structured lipids were synthesized at two flow rates (8 and 13 g/min) in a packed-bed reactor with different Lipozyme TL IM amounts (150 g, 125 g and 100 g), respectively. Abbreviation in TAG species: L: linoleic acid; O: oleic acid; P: palmitic acid; S: stearic acid.

카놀라유(Ca)와 PEE, StEE의 기질 몰비율을 1:3:6(w/w/w)로 하여 Lipozyme TLIM의 양 (100 g, 125 g, 150 g)과 기질유량(8 g/min, 13 g/min)에 따른 TAG 조성을 Table 12에 나타내었다. 1:3:6의 기질 유량이 8 g/min 일때에는 Lipozyme TLIM 150 g, 125 g, 100 g으로 반응 하였을 때 OOO가 검출되지 않았다(Table 12). 또한, 1:3:6의 기질 유량이 13 g/min 일 때, TLIM 150 g에서는 OOO의 함량이 0.56%이었으며, TLIM 125 g와 TLIM 100 g일 때 OOO의 함량은 각각 0.87%와 5.24%이었다. 반응물에서의 POP/POS/SOS의 생성률을 살펴 보면, 1:3:6의 기질 유량이 8 g/min 일 때 TLIM 150 g에서는 POP 13.25%, POS 32.89%, SOS 22.92% 이었으며, TLIM 125 g에서는 POP 13.10%, POS 35.52%, SOS 21.00%, TLIM 100 g에서는 POP 12.24%, POS 24.25%, SOS 12.69% 이었다. 효소의 양이 높을수록 생성되는 POP/POS/SOS의 함량은 높아지는 경향을 나타내었다. 1:3:6의 기질 유량이 13 g/min 일 때 TLIM 150 g에서는 POP 12.66%, POS 29.74%, SOS 21.40% 이었으며, TLIM 125 g에서는 POP 12.85%, POS 28.65%, SOS 20.89%, TLIM 100 g에서는 POP 8.49%, POS 16.97%, SOS 8.38% 이었다.

Table 12. Triacylglycerol species and equivalent carbon number (ECN) of structured lipids synthesized with substrate molar ratio of 1:3:6 (Ca:PEE:StEE, w/w/w).

ECN	TAG species	TL IM, 150 g		TL IM, 125 g		TL IM, 100 g	
		8 g/min	13 g/min	8 g/min	13 g/min	8 g/min	13 g/min
46	LOO	-	0.36±0.03	-	0.50±	1.57±0.13	4.28±0.05
	LOP	2.18±0.29	4.63±0.40	1.92±0.79	4.84±0.21	7.81±1.28	9.64±0.49
	PLP/SLP	2.22±0.08	2.33±0.30	2.42±0.54	2.53±0.71	2.68±0.16	2.27±0.12
48	OOO	-	0.56±0.22	-	0.87±0.10	-	5.24±0.78
	POO	5.74±0.06	10.94±0.70	3.30±0.65	12.39±0.49	20.14±0.20	24.88±1.77
	POP	13.25±0.63	12.66±0.51	13.10±0.17	12.85±0.36	12.24±0.30	8.49±0.24
50	SOO	5.65±0.38	11.03±0.30	5.01±0.98	12.13±0.74	13.59±0.06	16.58±1.49
	POS	32.89±1.32	29.74±0.57	35.52±5.51	28.65±1.17	24.25±1.20	16.97±0.52
	PPS	2.12±0.16	0.84±0.07	2.95±1.39	0.74±0.06	0.45±0.28	0.21±0.0
52	SOS	22.92±1.07	21.40±1.14	21.00±2.56	20.89±1.70	12.69±0.27	8.38±0.09
	SSP	8.47±0.45	3.52±0.06	8.98±0.62	2.48±0.29	1.87±0.26	0.53±0.03
54	SSS	4.48±0.18	1.78±0.16	5.81±0.24	1.41±0.14	0.84±0.39	-

Structured lipids were synthesized at two flow rates (8 and 13 g/min) in a packed-bed reactor with different Lipozyme TL IM amounts (150 g, 125 g and 100 g), respectively. Abbreviation in TAG species: L: linoleic acid; O: oleic acid; P: palmitic acid; S: stearic acid.

카놀라유(Ca)와 palmitic ethyl ester(PEE), stearic ethyl ester(StEE)의 기질 몰비율(1:2:2, 1:2:4, 1:2:6, 1:3:6, w/w/w)에 따른 연속식 반응기에서 합성한 반응물의 POP/POS/SOS의 생성률을 살펴보았다(Fig. 13-15). Figure 13에서는 Lipozyme TLIM 150 g으로 충전되어 있는 연속식반응기에서 유량을 8 g/min와 13 g/min으로 수행하였을 때 각 기질별로 생성되는 POP/POS/SOS의 생성률을 살펴보았다. 유량이 8 g/min 일때에는 기질들의 몰비율에서 StEE의 기질 비율이 증가할수록 POS와 SOS의 함량이 증가하는 경향을 나타내었다. 또한, 유량이 13 g/min일때에는 8 g/min 일때 보다는 낮지만, StEE의 기질 비율이 증가할수록 POS와 SOS의 함량이 증가하는 경향을 나타내었다.

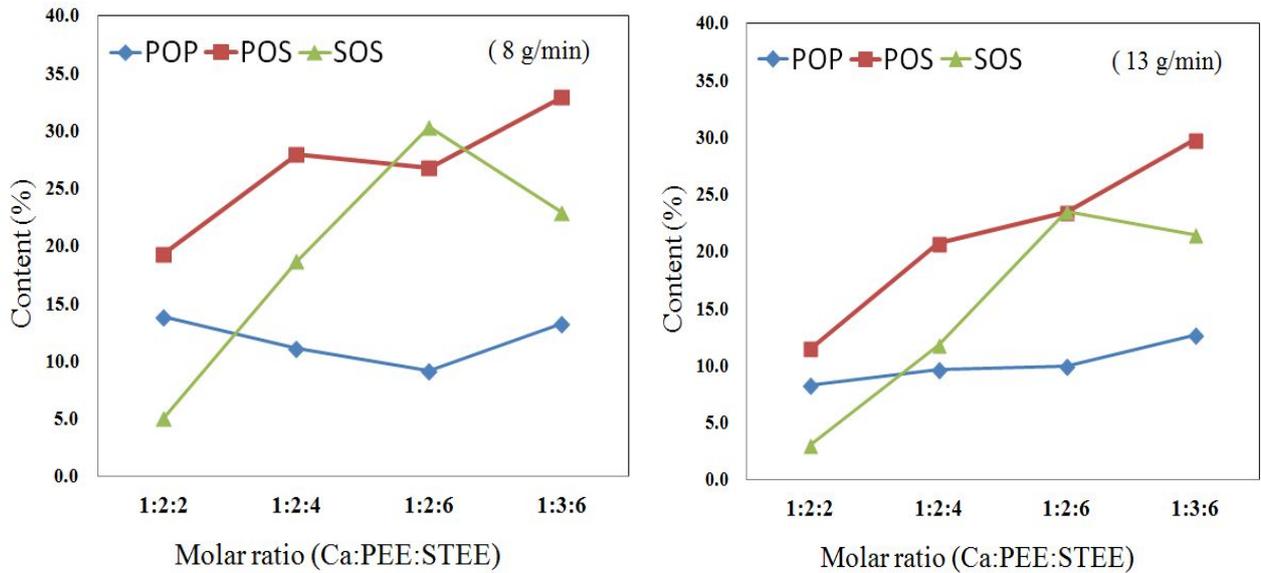


Fig. 13. Effect of substrate ratio on POP, POS and SOS formation in a packed-bed reactor with 150 g of Lipozyme TL IM. Flow rates were 8 and 13 g/min, respectively.

Figure 14에서는 Lipozyme TLIM 125 g으로 충전되어 있는 연속식반응기에서 유량을 8 g/min와 13 g/min으로 수행하였을 때 각 기질별로 생성되는 POP/POS/SOS의 생성률을 살펴 보았다. 유량이 8 g/min일 때에는 TLIM 150 g과 마찬가지로 기질들의 몰비율에서 StEE의 기질 비율이 증가할수록 POS와 SOS의 함량이 증가하는 경향을 나타내었다. 유량이 13 g/min일 때에는 8 g/min일 때보다는 낮았지만, StEE의 기질 비율이 증가할수록 POS와 SOS의 함량이 증가하는 경향을 나타내었다.

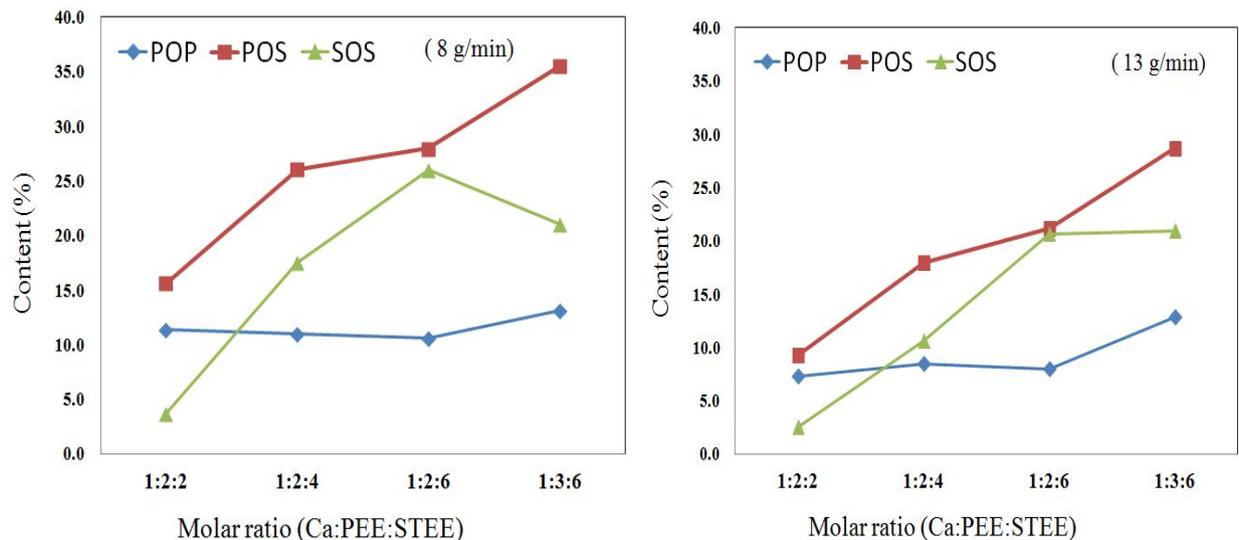


Fig. 14. Effect of substrate ratio on POP, POS and SOS formation in a packed-bed reactor with 125 g of Lipozyme TL IM. Flow rates were 8 and 13 g/min, respectively.

Figure 15에서는 Lipozyme TLIM 100 g으로 충전되어 있는 연속식반응기에서 유량을 8 g/min와 13 g/min으로 수행하였을 때 각 기질별로 생성되는 POP/POS/SOS의 생성률을 살펴 보았다. 유량이 8 g/min 일때에는 기질들의 몰비율에서 StEE의 기질 비율이 증가할수록 POS와 SOS의 함량이 증가하는 경향을 나타내었다. 유량이 13 g/min 일때에는 8 g/min 일 때 보다는 낮았지만, StEE의 기질 비율이 증가할수록 POS와 SOS의 함량이 증가하는 경향을 나타내었다. TLIM 100 g으로 반응 하였을때는 TLIM 125 g과 TLIM 150 g으로 사용하였을 때보다는 POP/POS/SOS의 생성률이 비교적 낮은 경향을 나타내었다.

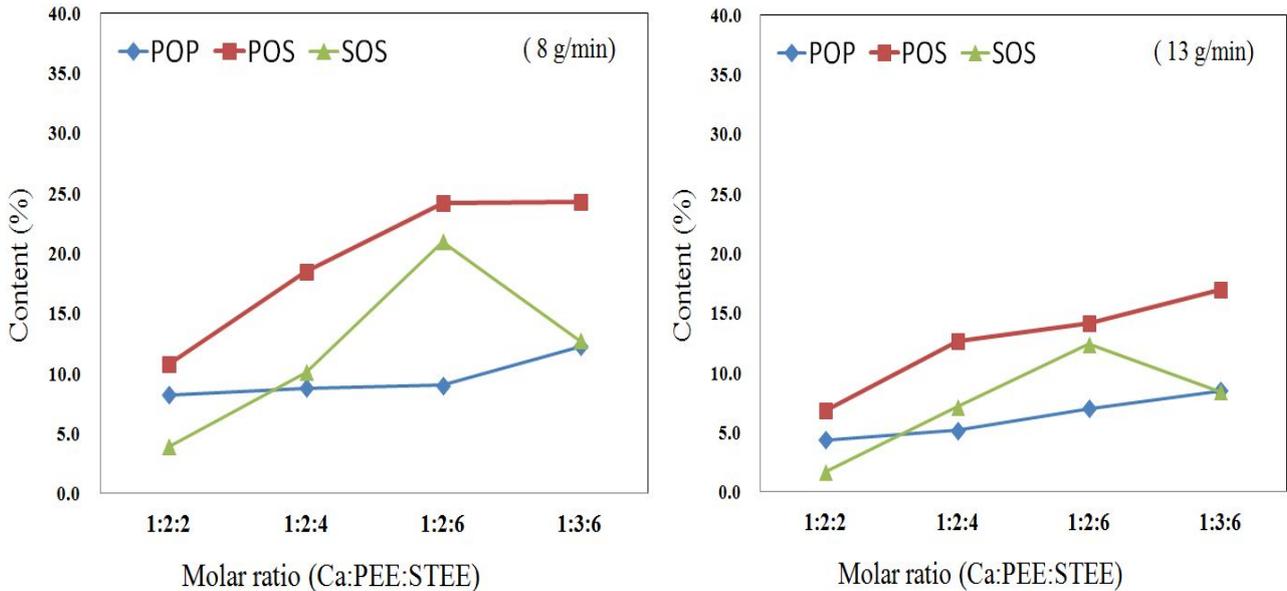


Fig. 15. Effect of substrate ratio on POP, POS and SOS formation in a packed-bed reactor with 100 g of Lipozyme TL IM. Flow rates were 8 and 13 g/min, respectively.

(2) 연속식 반응기에서 합성한 반응물의 지방산 조성 변화

Lipozyme TLIM 으로 각각 100 g, 125 g, 150 g으로 충전되어 연속식 반응기에서 카놀라유(Ca)와 palmitic ethyl ester(PEE), stearic ethyl ester(StEE)를 기질 몰비율(Ca:PEE:StEE, 1:2:2, 1:2:4, 1:2:6, 1:3:6)별로 반응하였다. 이때 각 기질의 유량은 8 g/min과 13 g/min으로 설정하여 합성한 반응물의 지방산 조성을 분석하였다. Table 13-16에서는 각 반응 기질들의 합성 조건별 총 지방산조성을 나타내었다. 반응물에서 palmitic acid(C16:0, P)와 stearic acid(C18:0, S) 함량이 증가할수록 카놀라유에서 palmitic acid와 stearic acid의 합성율이 증가함을 나타낸다. 기질 몰비율(1:2:2, 1:2:4, 1:2:6, 1:3:6, Ca:PEE:StEE)에서 효소량이 많을수록 그리고 기질 유량이 낮을수록 palmitic acid와 stearic acid의 합성율이 높아지는 경향을 나타내었다. 1:2:2의 몰비율에서는 유량 8 g/min에서 효소량이 150 g일때, palmitic acid와 stearic acid(P+S)의 합성율이 44.81% 이었으며, 125 g일때 39.65%, 100 g일때 35.56% 이었다(Table 13). 유량 13 g/min에서는 효소량이 150 g일때, palmitic acid와 stearic acid(P+S)의 합성율이 34.47% 이었으며, 125 g일때 33.51%, 100 g일때 29.20% 이었다(Table 13). 1:2:4의 몰비율에서는 유량 8 g/min에서 효소량이 150 g, 125 g, 100 g 일때, palmitic acid와

stearic acid(P+S)의 합성율이 각각 54.20%, 50.42%, 42.42% 이었으며, 유량 13 g/min에서 효소양이 150 g, 125 g, 100 g 일때, palmitic acid와 stearic acid(P+S)의 합성율이 각각 42.88%, 41.47%, 34.71% 이었다(Table 14). 1:2:6의 몰비율에서는 유량 8 g/min에서 효소양이 150 g, 125 g, 100 g 일때, P+S의 합성율이 각각 61.74%, 56.09%, 49.14% 이었으며, 유량 13 g/min에서 효소양이 150 g, 125 g, 100 g 일때, P+S의 합성율이 각각 50.19%, 47.73%, 40.73% 이었다(Table 15). 마지막으로 1:3:6의 몰비율에서는 유량 8 g/min에서 효소양이 150 g, 125 g, 100 g 일때, P+S의 합성율이 각각 62.32%, 64.58%, 48.30% 이었으며, 유량 13 g/min에서 효소양이 150 g, 125 g, 100 g 일때, P+S의 합성율이 각각 54.26%, 51.65%, 40.26% 이었다(Table 16).

Table 13. Total fatty acid composition of structured lipids synthesized with substrate molar ratio of 1:2:2 (Ca:PEE:StEE, w/w/w).

Fatty acids	TL IM, 150 g		TL IM, 125 g		TL IM, 100 g	
	8 g/min	13 g/min	8 g/min	13 g/min	8 g/min	13 g/min
C16:0(P)	21.60±0.08	17.43±0.01	19.51±0.05	16.66±0.23	18.00±0.06	15.08±0.08
C18:0(S)	23.21±0.18	17.04±0.09	20.15±0.02	16.85±0.11	17.56±0.16	14.13±0.08
C18:1(O)	36.87±0.06	43.76±0.02	40.53±0.23	45.27±0.08	43.19±0.01	48.66±0.07
C18:2(L)	13.27±0.04	15.20±0.04	14.32±0.12	15.41±0.02	15.06±0.12	15.66±0.08
C18:3n3(Ln)	5.05±0.01	6.01±0.08	5.51±0.04	5.86±0.02	5.93±0.13	5.89±0.02
P+S <sup>1)</sup>	44.81±0.11	34.47±0.11	39.65±0.07	33.51±0.12	35.56±0.09	29.20±0.00

Structured lipids were synthesized at two flow rates (8 and 13 g/min) in a packed-bed reactor with different Lipozyme TL IM amounts (150 g, 125 g and 100 g), respectively.

<sup>1)</sup> P+S : Sum of palmitic acid (P) and stearic acid (S).

Table 14. Total fatty acid composition of structured lipids synthesized with substrate molar ratio of 1:2:4 (Ca:PEE:StEE, w/w/w).

Fatty acids	TL IM, 150 g		TL IM, 125 g		TL IM, 100 g	
	8 g/min	13 g/min	8 g/min	13 g/min	8 g/min	13 g/min
C16:0(P)	17.67±0.03	14.74±0.05	16.41±0.02	14.03±0.07	14.66±0.02	12.45±0.08
C18:0(S)	36.53±0.04	28.15±0.02	34.02±0.02	27.44±0.16	27.76±0.07	22.27±0.01
C18:1(O)	29.81±0.01	37.88±0.11	32.28±0.01	38.70±0.07	37.79±0.13	44.04±0.06
C18:2(L)	11.27±0.01	13.53±0.01	12.14±0.01	13.98±0.10	13.78±0.0	14.91±0.08
C18:3n3(Ln)	4.26±0.01	5.15±0.06	4.60±0.01	5.38±0.08	5.43±0.04	5.74±0.06
P+S <sup>1)</sup>	54.20±0.01	42.88±0.03	50.42±0.00	41.47±0.23	42.42±0.09	34.71±0.08

Structured lipids were synthesized at two flow rates (8 and 13 g/min) in a packed-bed reactor with different Lipozyme TL IM amounts (150 g, 125 g and 100 g), respectively.

<sup>1)</sup> P+S : Sum of palmitic acid (P) and stearic acid (S).

Table 15. Total fatty acid composition of structured lipids synthesized with substrate molar ratio of 1:2:6 (Ca:PEE:StEE, w/w/w).

Fatty acids	TL IM, 150 g		TL IM, 125 g		TL IM, 100 g	
	8 g/min	13 g/min	8 g/min	13 g/min	8 g/min	13 g/min
C16:0(P)	14.77±0.01	13.36±0.40	14.96±0.04	12.13±0.01	12.74±0.06	11.15±0.04
C18:0(S)	46.97±0.16	36.83±0.30	41.13±0.28	35.60±0.08	36.40±0.06	29.58±0.04
C18:1(O)	24.32±0.01	32.29±0.39	28.15±0.08	34.49±0.07	32.89±0.18	39.46±0.02
C18:2(L)	9.79±0.08	12.30±0.19	11.06±0.12	12.64±0.04	12.56±0.02	13.86±0.06
C18:3n3(Ln)	3.69±0.09	4.69±0.13	4.19±0.12	4.65±0.01	4.85±0.08	5.35±0.03
P+S <sup>1)</sup>	61.74±0.18	50.19±0.10	56.09±0.32	47.73±0.09	49.14±0.11	40.73±0.08

Structured lipids were synthesized at two flow rates (8 and 13 g/min) in a packed-bed reactor with different Lipozyme TL IM amounts (150 g, 125 g and 100 g), respectively.

<sup>1)</sup> P+S : Sum of palmitic acid (P) and stearic acid (S).

Table 16. Total fatty acid composition of structured lipids synthesized with substrate molar ratio of 1:3:6 (Ca:PEE:StEE, w/w/w).

Fatty acids	TL IM, 150 g		TL IM, 125 g		TL IM, 100 g	
	8 g/min	13 g/min	8 g/min	13 g/min	8 g/min	13 g/min
C16:0(P)	20.38±0.52	17.83±0.00	19.73±0.04	16.84±0.13	16.45±0.02	14.03±0.11
C18:0(S)	41.94±0.54	36.43±0.29	44.85±0.44	34.81±0.28	31.85±0.34	26.23±0.17
C18:1(O)	24.01±0.22	30.07±0.02	22.49±0.10	31.34±0.06	33.74±0.23	40.22±0.05
C18:2(L)	9.71±0.11	11.26±0.05	9.16±0.21	11.91±0.24	12.65±0.06	13.87±0.03
C18:3n3(Ln)	3.50±0.16	4.03±0.04	3.32±0.19	4.64±0.22	4.83±0.04	5.07±0.08
P+S <sup>1)</sup>	62.32±0.02	54.26±0.29	64.58±0.48	51.65±0.40	48.30±0.32	40.26±0.06

Structured lipids were synthesized at two flow rates (8 and 13 g/min) in a packed-bed reactor with different Lipozyme TL IM amounts (150 g, 125 g and 100 g), respectively.

<sup>1)</sup> P+S : Sum of palmitic acid (P) and stearic acid (S).

Table 17-20에서는 각 반응 기질들의 합성 조건별 sn-2 위치에서의 지방산조성을 나타내었다. 반응물의 총지방산 조성에서 palmitic acid(C16:0, P)와 stearic acid(C18:0, S) 함량이 증가할수록 카놀라유에서 palmitic acid와 stearic acid의 결합율이 증가함을 나타낸다. 반응물에서 sn-2 위치에서 palmitic acid와 stearic acid의 합성율이 증가함은 acyl migration으로 인한 것으로 예측되었다. 연속식 반응기에 충전된 효소의 양의 많을수록, 그리고 기질의 유량이 낮을수록 acyl migration으로 인한 sn-2 위치에서 palmitic acid와 stearic acid의 합성율이 증가함을 확인하였다. 기질의 몰비율들(1:2:2, 1:2:4, 1:2:6, Ca:PEE:StEE)에서는 기질들의 비율이 증가 할수록 조금씩 증가하는 경향을 나타내었다. 1:2:6의 몰비율에서 유량 8

g/min에서 효소양이 150 g일때, palmitic acid와 stearic acid(P+S)의 합성율이 35.36% 이었 으며, 125 g일때 25.22%, 100 g일때 17.13% 이었다(Table 19). 유량 13 g/min에서는 효소양 이 150 g일때, palmitic acid와 stearic acid(P+S)의 합성율이 18.23% 이었으며, 125 g일때 17.46%, 100 g일때 10.74% 이었다(Table 19). 1:3:6의 몰비율에서는 유량 8 g/min에서 효소 양이 150 g, 125 g, 100 g 일때, P+S의 합성율은 각각 30.10%, 31.61%, 16.70% 이었으며, 유 량 13 g/min에서는 효소양이 150 g, 125 g, 100 g 일때, P+S의 합성율은 각각 19.66%, 17.55%, 9.88% 이었다(Table 20).

Table 17. Fatty acid composition at sn-2 position of structured lipids synthesized with substrate molar ratio of 1:2:2 (Ca:PEE:StEE, w/w/w).

Fatty acids	TL IM, 150 g		TL IM, 125 g		TL IM, 100 g	
	8 g/min	13 g/min	8 g/min	13 g/min	8 g/min	13 g/min
C16:0(P)	9.69±0.30	4.96±0.01	6.79±0.01	5.08±0.21	4.96±0.06	3.56±0.03
C18:0(S)	9.34±0.23	4.94±0.03	6.67±0.01	4.58±0.03	4.81±0.03	3.28±0.08
C18:1(O)	44.66±1.42	51.49±0.18	49.29±0.04	50.65±0.45	51.71±0.37	52.85±0.28
C18:2(L)	23.11±0.48	27.73±0.06	25.70±0.06	27.37±0.13	27.80±0.16	28.98±0.19
C18:3n3(Ln)	8.84±0.05	10.75±0.10	9.56±0.03	10.40±0.09	10.60±0.16	11.23±0.21
P+S <sup>1)</sup>	19.03±0.53	9.90±0.01	13.46±0.02	9.66±0.18	9.77±0.04	6.84±0.11

Structured lipids were synthesized at two flow rates (8 and 13 g/min) in a packed-bed reactor with different Lipozyme TL IM amounts (150 g, 125 g and 100 g), respectively.

<sup>1)</sup> P+S : Sum of palmitic acid (P) and stearic acid (S).

Table 18. Fatty acid composition at sn-2 position of structured lipids synthesized with substrate molar ratio of 1:2:4 (Ca:PEE:StEE, w/w/w).

Fatty acids	TL IM, 150 g		TL IM, 125 g		TL IM, 100 g	
	8 g/min	13 g/min	8 g/min	13 g/min	8 g/min	13 g/min
C16:0(P)	9.23±0.46	4.65±0.01	7.54±0.23	5.10±0.12	6.09±1.90	3.54±0.06
C18:0(S)	18.03±0.28	8.67±0.04	18.00±3.30	9.31±0.09	11.01±3.71	6.48±0.08
C18:1(O)	41.53±0.20	49.92±0.16	42.78±2.28	48.51±1.51	47.55±2.43	51.27±0.08
C18:2(L)	21.03±0.30	26.54±0.08	21.93±1.15	25.42±0.26	25.76±1.62	27.91±0.07
C18:3n3(Ln)	7.75±0.16	10.08±0.10	8.05±0.13	9.10±0.22	9.51±1.47	10.68±0.0
P+S <sup>1)</sup>	27.26±0.74	13.31±0.03	25.54±3.53	14.40±0.21	17.09±5.61	10.02±0.15

Structured lipids were synthesized at two flow rates (8 and 13 g/min) in a packed-bed reactor with different Lipozyme TL IM amounts (150 g, 125 g and 100 g), respectively.

<sup>1)</sup> P+S : Sum of palmitic acid (P) and stearic acid (S).

Table 19. Fatty acid composition at sn-2 position of structured lipids synthesized with substrate molar ratio of 1:2:6 (Ca:PEE:StEE, w/w/w).

Fatty acids	TL IM, 150 g		TL IM, 125 g		TL IM, 100 g	
	8 g/min	13 g/min	8 g/min	13 g/min	8 g/min	13 g/min
C16:0(P)	8.71±0.09	4.90±0.04	6.97±0.05	4.66±0.38	4.68±0.15	3.18±0.06
C18:0(S)	26.66±0.52	13.33±0.03	18.26±0.15	12.80±0.63	12.45±0.08	7.57±0.05
C18:1(O)	34.11±1.46	46.48±0.29	42.22±0.19	46.99±0.40	46.86±0.05	50.02±0.18
C18:2(L)	18.07±0.88	25.28±0.07	22.07±0.04	24.67±0.52	25.74±0.08	28.06±0.01
C18:3n3(Ln)	6.77±0.27	9.85±0.13	8.23±0.18	9.05±0.20	10.11±0.10	11.08±0.08
P+S <sup>1)</sup>	35.36±0.61	18.23±0.07	25.22±0.20	17.46±1.01	17.13±0.23	10.74±0.11

Structured lipids were synthesized at two flow rates (8 and 13 g/min) in a packed-bed reactor with different Lipozyme TL IM amounts (150 g, 125 g and 100 g), respectively.

<sup>1)</sup> P+S : Sum of palmitic acid (P) and stearic acid (S).

Table 20. Fatty acid composition at sn-2 position of structured lipids synthesized with substrate molar ratio of 1:3:6 (Ca:PEE:StEE, w/w/w).

Fatty acids	TL IM, 150 g		TL IM, 125 g		TL IM, 100 g	
	8 g/min	13 g/min	8 g/min	13 g/min	8 g/min	13 g/min
C16:0(P)	9.82±0.04	6.75±0.01	10.32±0.12	5.93±0.08	6.32±0.28	3.63±0.13
C18:0(S)	20.28±0.08	12.91±0.09	21.30±1.11	11.62±0.01	10.39±0.05	6.25±0.11
C18:1(O)	40.50±0.25	45.72±0.22	38.53±0.73	46.81±0.41	47.30±0.23	50.31±0.30
C18:2(L)	21.39±0.11	24.96±0.01	21.66±0.27	25.85±0.07	25.80±0.06	28.45±0.02
C18:3n3(Ln)	7.99±0.10	9.52±0.09	8.18±0.25	9.77±0.25	10.02±0.04	11.26±0.07
P+S <sup>1)</sup>	30.10±0.04	19.66±0.11	31.61±1.23	17.55±0.09	16.70±0.23	9.88±0.23

Structured lipids were synthesized at two flow rates (8 and 13 g/min) in a packed-bed reactor with different Lipozyme TL IM amounts (150 g, 125 g and 100 g), respectively.

<sup>1)</sup> P+S : Sum of palmitic acid (P) and stearic acid (S).

나. 연속식 반응기(packed-bed reactor)를 이용한 코코아버터 유사지의 symmetrical 특성 연구

(1) 연속식 반응기에서 합성한 반응물의 symmetrical triacylglycerol(TAG) 조성

합성한 반응물에서 TAG들의 지방산조성을 포화(Saturated)-불포화(Unsaturated)-포화(Saturated) 지방산으로 구성되어 있는지를 확인하기 위하여 normal-phase HPLC 분석을 수행하였다. 분석에 사용된 column은 CPS hypersil column으로 TAG를 SUS(포화-불포화-

포화 지방산)와 SSU(포화-포화-불포화 지방산)으로 분리해준다. 따라서 본 연구에서는 반응물들로부터 부산물로 생성되는 ethylester들을 증류를 통하여 제거한 후 다음 얻어진 TAG들을 Figure 16-20에 나타내었다. 증류를 수행한 반응물은 기질비율 1:2:4의 100 g 효소반응과 기질비율 1:2:6과 1:3:6의 150 g, 125 g, 100 g의 효소양을 가지고 반응한 반응물들이었다. 부산물인 ethylester를 제거한 후 얻어진 TAG들의 반응물을 SMS(Saturated-Monounsaturated-Saturated)와 SSM(Saturated-Saturated-Monounsaturated)으로 구분하였다. 대표적인 SMS 형태의 TAG에는 코코아버터에서 대부분을 차지하는 SOS(1,3-distearoyl-2-oleoyl glycerol)/POS(1(3)-palmitoyl-3(1)-stearoyl-2-oleoyl glycerol)/POP(1,3-dipalmitoyl-2-oleoyl glycerol)를 들 수 있다. 기질 1:2:4의 몰비율에서는 100 g의 효소에서 8 g/min일때 SMS는 40%내외이었으며, SMM은 41%내외 이었다. 대표적인 SMM 유형의 TAG에는 SOO와 POO를 들 수 있다(Fig. 16). 이때 acylmigration에 의해 생성될 수 있는 SSM은 4%내외 이었다. 기질 1:2:4의 몰비율에서는 100 g의 효소에서 13 g/min일때 SMS는 23%내외이었으며, SSM은 2%내외 이었다. 그리고 SMM은 54%내외 이었다(Fig. 16). 유량이 높을수록 합성되는 반응물에서 SMS의 함량은 높아지며, SMM의 함량은 감소하는 경향을 나타내었다.

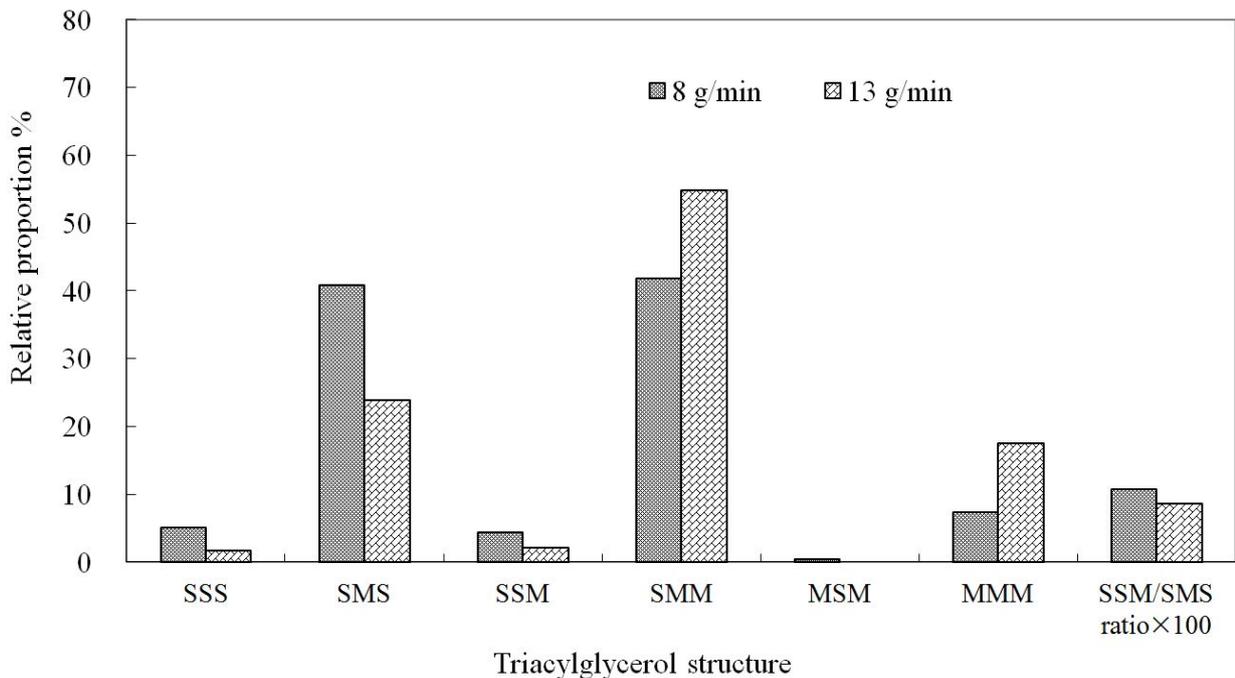


Fig. 16. Triacylglycerol structures of structured lipids synthesized using 1:2:4 (Ca: PEE: StEE, w/w/w) substrate ratio in a packed-bed reactor with 100 g of Lipozyme TL IM. Flow rates were 8 and 13 g/min, respectively. The ethyl esters in these structured lipids were removed by distillation. Abbreviation in TAG structures: S: saturated fatty acids; M: monounsaturated fatty acids(ex. oleic acid).

기질 1:2:6의 몰비율에서는 유량이 8 g/min 일때와 13 g/min 일때의 효소양(150 g, 125 g, 100 g)에 따른 반응물에서 symmetrical TAG조성 변화를 Fig. 17-18에 나타내었다. 유량이 8 g/min 일때 효소양 150 g, 125 g, 100 g 일때 SMS의 조성은 각각 46%, 52%, 51% 이었

으며, SSM의 조성은 8%, 6%, 5%를 나타내었다(Fig. 17). 또한, SMM의 조성은 각각 12%, 21%, 30% 이었다. SSM에 대한 SMS의 비율(SSM/SMS ratio)를 계산한 결과, 각각 17.8%, 12.7%, 10.5%를 나타내었다. 반응하는 효소의 양이 작을수록 SSM의 함량은 낮았으며, SMM의 조성은 증가하는 경향을 나타내었다. 유량이 13 g/min 일때 효소양 150 g, 125 g, 100 g 일때 SMS의 조성은 각각 49%, 46%, 38% 이었으며, SSM의 조성은 각각 5%, 5%, 3%를 나타내었고, SMM의 조성은 각각 30%, 34%, 43%를 나타내었다(Fig. 18). SSM에 대한 SMS의 비율(SSM/SMS ratio)를 계산한 결과, 각 효소양 별로 11.4%, 11.7%, 9.5%를 나타내었다. SSM/SMS ratio이 낮을수록 acylmigration으로 인하여 생성되는 SSM의 함량이 낮아짐을 알 수 있었다. 기질의 유량이 낮을수록, 또한 사용된 효소의 양이 높을수록 acylmigration으로 인하여 생성되는 SSM의 함량은 높아지며, SMM의 함량은 낮아짐을 알 수 있었다.

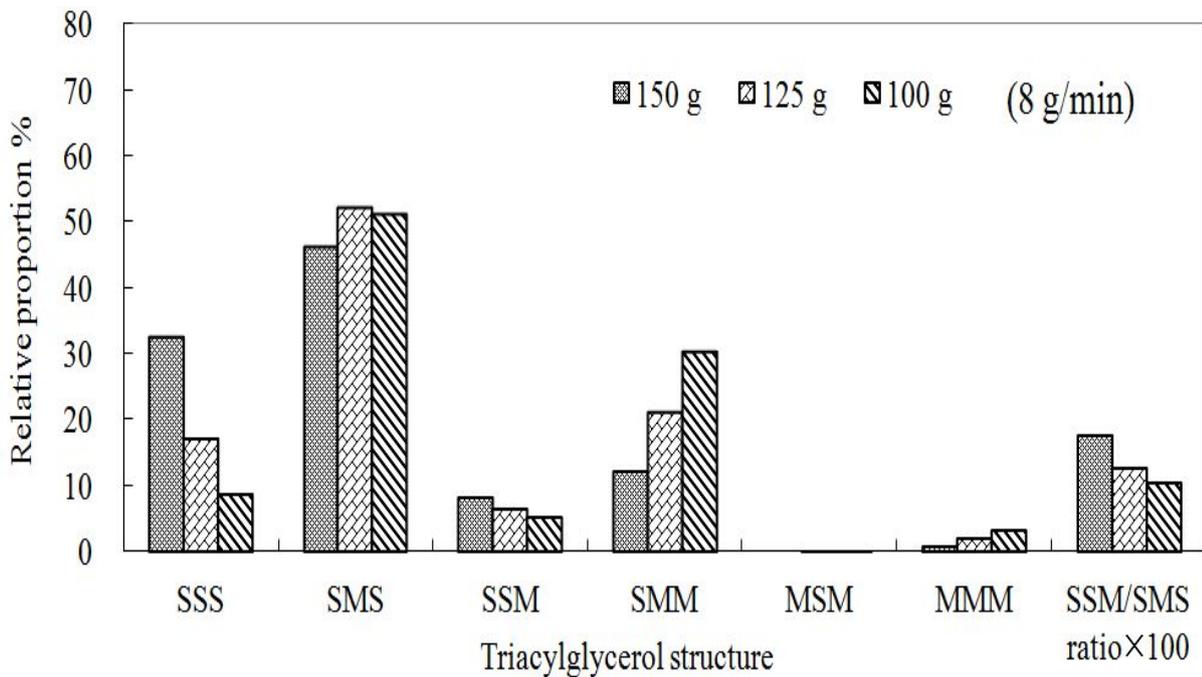


Fig. 17. Triacylglycerol structures of structured lipids synthesized using 1:2:6 (Ca: PEE: StEE, w/w/w) substrate ratio in a packed-bed reactor with different Lipozyme TL IM amounts (150 g, 125 g, 100 g). Flow rate of a packed-bed reactor was 8 g/min. The ethyl esters in these structured lipids were removed by distillation. Abbreviation in TAG structures: S: saturated fatty acids; M: monounsaturated fatty acids(ex. oleic acid).

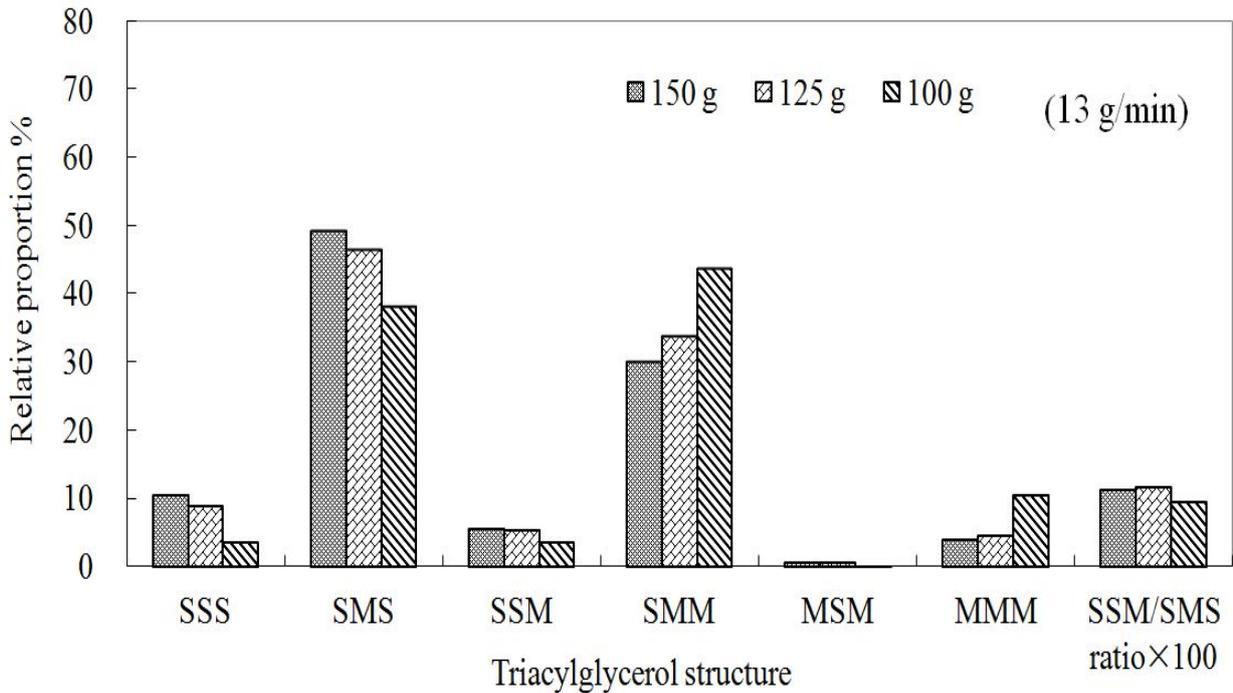


Fig. 18. Triacylglycerol structures of structured lipids synthesized using 1:2:6 (Ca: PEE: StEE, w/w/w) substrate ratio in a packed-bed reactor with different Lipozyme TL IM amounts (150 g, 125 g, 100 g). Flow rate of a packed-bed reactor was 13 g/min. The ethyl esters in these structured lipids were removed by distillation. Abbreviation in TAG structures: S: saturated fatty acids; M: monounsaturated fatty acids(ex. oleic acid).

기질 1:3:6의 몰비율에서는 유량이 8 g/min 일때와 13 g/min 일때의 효소양(150 g, 125 g, 100 g)에 따른 반응물에서 symmetrical TAG 조성 변화를 Fig. 19-20에 나타내었다. 유량이 8 g/min 일때 효소양 150 g, 125 g, 100 g 으로 반응 하였을 때 SMS의 조성은 각각 50%, 55%, 49% 이었으며, SSM의 조성은 6%, 4%, 4%를 나타내었다(Fig. 19). 또한, SMM의 조성은 각각 13%, 10%, 34% 이었다. SSM에 대한 SMS의 비율(SSM/SMS ratio)를 계산한 결과, 각각 12.1%, 7.2%, 8.5%를 나타내었다. 유량이 13 g/min 일때 효소양 150 g, 125 g, 100 g 으로 반응 하였을 때 SMS의 조성은 각각 50%, 54%, 37% 이었으며, SSM의 조성은 각각 5%, 4%, 3%를 나타내었고, SMM의 조성은 각각 29%, 27%, 46%를 나타내었다(Fig. 20). SSM에 대한 SMS의 비율(SSM/SMS ratio)를 계산한 결과, 각 효소양 별로 9.0%, 8.1%, 7.3%를 나타내었다. SSM/SMS ratio이 낮을수록 acylmigration으로 인하여 생성되는 SSM의 함량이 낮아짐을 알 수 있었다.

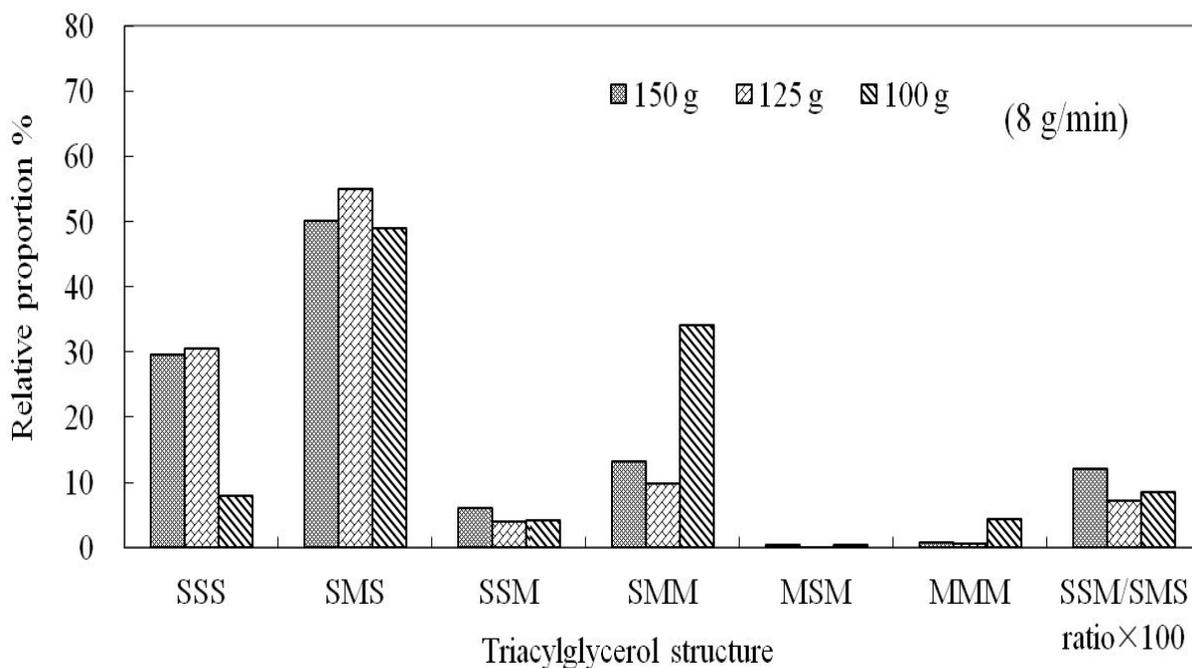


Fig. 19. Triacylglycerol structures of structured lipids synthesized using 1:3:6 (Ca: PEE: StEE, w/w/w) substrate ratio in a packed-bed reactor with different Lipozyme TL IM amounts (150 g, 125 g, 100 g). Flow rate of a packed-bed reactor was 8 g/min. The ethyl esters in these structured lipids were removed by distillation. Abbreviation in TAG structures: S: saturated fatty acids; M: monounsaturated fatty acids(ex. oleic acid).

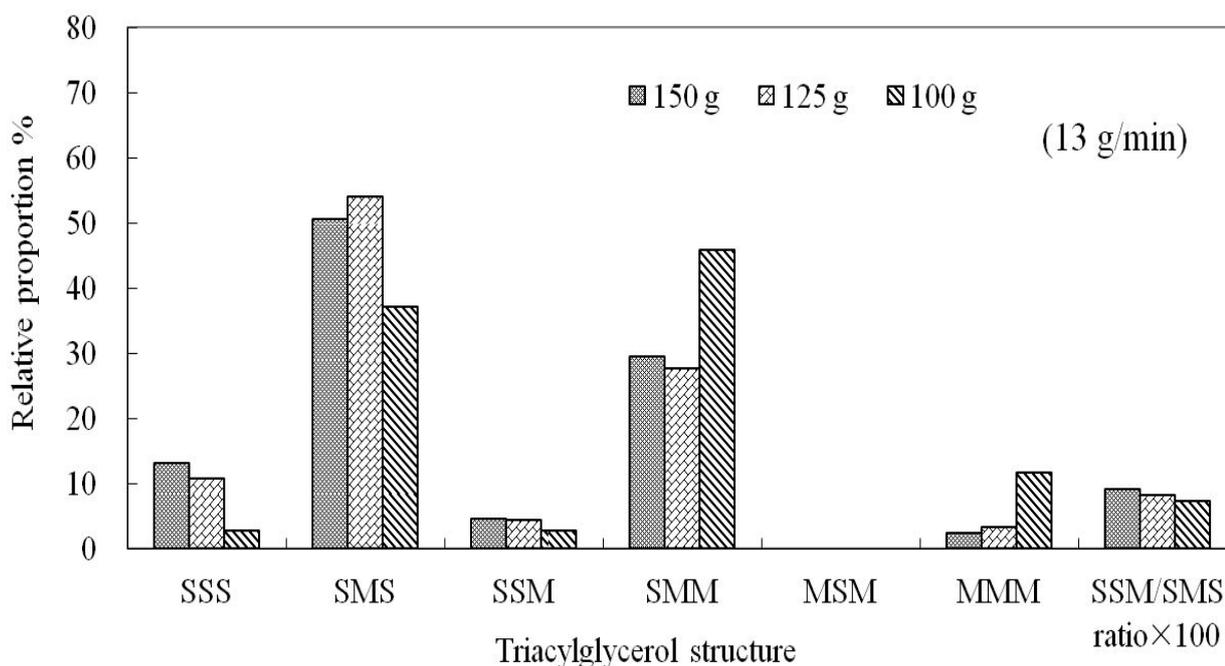


Fig. 20. Triacylglycerol structures of structured lipids synthesized using 1:3:6 (Ca: PEE: StEE, w/w/w) substrate ratio in a packed-bed reactor with different Lipozyme TL IM amounts (150 g, 125 g, 100 g). Flow rate of a packed-bed reactor was 13 g/min. The ethyl esters in these structured lipids were removed by distillation. Abbreviation in TAG structures: S: saturated fatty acids; M: monounsaturated fatty acids(ex. oleic acid).

## 2. 효소법에 의한 회분식 에스테르 교차 대량합성 및 고진공 박막 증류 장치(TFE, High Vacuum Thin Film Evaporator)를 이용한 TAG/Ethyl ester의 분리(제1협동과제)

### 가. 효소법에 의한 회분식 에스테르 교차 대량합성

회분식반응기에서 기질과 앞질에서 대량합성에 성공한 Stearic ethyl ester(StEE)를 기질 무게비율 비율(56 kg : 78 kg)를 효소의 2.0 kg을 혼합하여 45°C에서 10시간 동안 2회 반복 실험을 실시하였다. 그 결과 POS/SOS가 설계와 유사한 경향을 얻을 수 있었다. 그 결과는 다음 Table 21에 요약하였다.

Table 21. 200 Liter 급 회분식 효소 반응에 의한 에스테르 교차합성 결과

반응차수	반응조건	TG의 (POS/SOS) 조성	비고
1	원료 : STEE 및 기질 : 134kg 효소 : 2.0 kg 반응온도 : 45°C 반응시간 : 10 시간	POS/PSO : 25 area% SOS : 18 area%, POP : 11 area%.	설계된 결과와 유사함
2	원료 : STEE 및 기질 : 134kg 효소 : 2.0 kg 반응온도 : 45°C 반응시간 : 10 시간	POS/PSO : 25 area% SOS : 18 area%, POP : 11 area%.	설계된 결과와 유사함

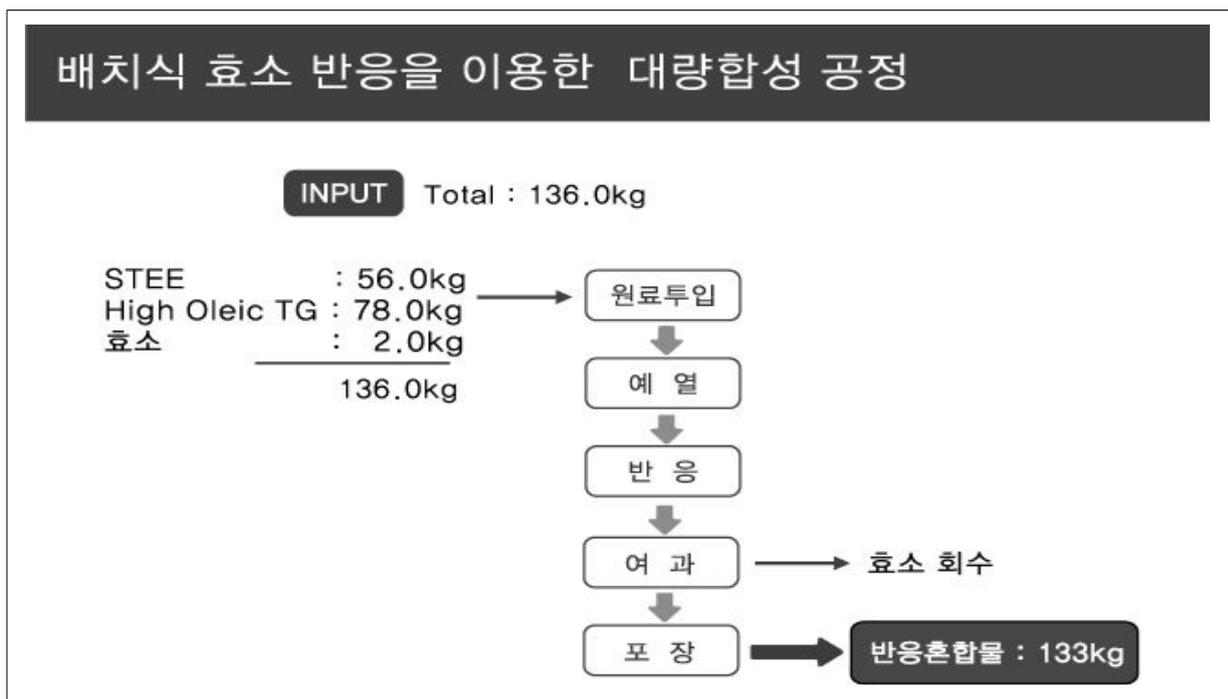


그림 21. Batch식 효소반응을 이용한 대량합성 공정



그림 22. 에스테르 교차반응기 (200 Liter, 한국 화학연구원)

나. 고진공 박막 증류 장치(TFE, High Vacuum Thin Film Evaporator)를 이용한 TAG/Ethyl ester의 분리

효소를 이용한 에스테르 교차 반응으로부터 시험 생산된 새로운 트리아실 글리세라이드 (TG)와 지방산 에스테르(FAEE) 화합물의 혼합물로부터 TAG 와 FAEE를 고진공 박막증류 장치를 이용해 분리하였다. 진공도 0.2 torr 하에서 220°C 로 가열하여 약 5 Liter/h의 속도로 원료를 주입하여 139.1 kg의 반응 혼합물을 박막 증류하여 TAG 75.4 kg 과 EE 63.7 kg 분리하는데 성공하였다. 분석결과 TAG는 순도가 99.5% 이상이었다. 이상의 결과는 다음 Table 22의 같은 결과를 얻을 수 있었다. 그림 23는 본 연구에 실제 적용된 고진공 박막증류 장치의 사진이다.

Table 22. 고진공 박막 증류장치를 이용한 TAG/EE의 분리결과

설비명	정제조건	결과	비고
TFE (고진공 박막 증류기)	증류온도 : 220 V 진공도 : 200~400 mmtorr 주입온도 : 60°C 냉각수 온도1 (내부) : 30°C 냉각수 온도2 (외부) : 40°C 원료 주입속도 : 5 Liter/h	원료량 : 139.1 kg Residue(TG) : 75.4 Distillate(EE) : 63.7	잔류 EE 0.5% 미만

[ 5 Liter/h 규모 고진공 박막 증류장치를 이용한 TG/EE의 분리 기준]

○ 5 Liter/h 규모 고진공 박막 증류장치



그림 23. 고진공 박막증류 장치 (5 Liter/h 규모, 한국 화학 연구원)

다. 효소법에 의한 회분식 에스테르 교차 대량합성 및 고진공 박막 증류 장치(TFE, High Vacuum Thin Film Evaporator)를 이용한 TAG/Ethyl ester의 분리 연구결과

(1) 효소법에 의한 TAG/EE 교차 합성 반응 (회분식) 결과 요약

[ 200 Liter 규모 Pilot 반응기]

반응차수	반응조건	TAG의 POS/SOS 조성	비고
1	원료 : STEE 및 기질 : 134kg 효소 : 2.0kg 반응온도 : 45℃ 반응시간 : 10 시간	POS/PSO : 25 area% SOS : 18 area%, POP : 11 area%.	설계된 결과와 유사함
2	원료 : STEE 및 기질 : 134kg 효소 : 2.0kg 반응온도 : 45℃ 반응시간 : 10 시간	POS/PSO : 25 area% SOS : 18 area%, POP : 11 area%.	설계된 결과와 유사함

(2) 고진공 박막 증류장치를 이용한 TAG/EE의 분리 결과 요약

[ 5 Liter/h 규모 고진공 박막 증류장치를 이용한 TG/EE의 분리 기준]

설비명	정제조건	결 과	비고
TFE 고진공 박막증류	증류온도 : 220℃ 진공도 : 200~400 mmtorr 주입온도 : 60℃ 냉각수 온도1 (내부) : 30℃ 냉각수 온도2 (외부) : 40℃	원료량 : 139.1kg Residue(TG) : 75.4 Distillate(EE) : 63.7	잔류 EE 0.5% 미만

**결과요약**

기질 134 kg(원료 INPUT)의 반응 혼합물을 위의 조건으로 박막 증류하여 중량 56%의 순도가 99.5% 이상인 TAG 반응물(OUTPUT)을 분리하였음.

### 제 3 절. 효소적 공법(연속식)에 의한 POS/SOS 합성 반응물의 정제법, 물리화학적 특성 연구 및 대량 정제를 통한 초콜릿의 제조

#### 1. 효소적 공법(연속식)에 의하여 합성한 반응물의 정제법(fractionation) 및 물리화학적 특성 연구(제1세부과제)

##### 가. 효소적 공법(연속식)에 의하여 합성한 반응물의 정제법(fractionation)

Lipozyme TLIM 으로 각각 100 g, 125 g, 150 g으로 충전되어 있는 연속식 반응기에서 카놀라유(Ca)와 palmitic ethyl ester(PEE), stearic ethyl ester(StEE)를 기질 몰비율(1:2:4, 1:2:6, 1:3:6, Ca:PEE:StEE)별로 반응하였다. 이때 각 기질의 유량은 8 g/min과 13 g/min으로 설정하여 합성한 반응물을 가지고 증류를 수행하여 ethylester를 제거하고, triacylglycerol(TAG)를 획득한 후 acetone fractionation을 통한 정제를 수행하였다. Acetone fractionation을 통하여 반응물로부터 코코아버터의 triacylglycerol 조성과 유사하도록 POP/POS/SOS가 주된 TAG 조성이 되도록 정제하였다. Acetone fractionation은 25℃에서 분획을 수행하여 얻어진 liquid 층을 다시 4℃에서 분획을 수행하여 solid층을 획득하였다. 이 4℃ solid 분획물 층에는 POP/POS/SOS가 다량 함유되었을 것으로 예측하였다. 각 반응물의 acetone fractionation을 수행하여 최종 얻어진 코코아버터 유사지의 yield(%)를 Table 23-25에 나타내었다.

기질 1:2:4의 몰비율에서는 100 g의 효소에서 8 g/min과 13 g/min 반응물을 분획한 결과, 각각 18.89%와 10.94%의 수율(yield, %)를 얻었다. 이는 기질에서 1:2:4의 기질 비율로 효소

양이 100 g 이었기 때문에 비교적 낮은 수율을 나타냄을 확인할 수 있었다(Table 23). 반응율이 비교적 낮았기 때문에 25°C solid 분획물의 yield는 낮았으며, 4°C liquid 분획물의 yield는 비교적 높은 경향을 나타내었다.

Table 23. Yield (%) after solvent fractionation of structured lipids synthesized with substrate molar ratio of 1:2:4 (Ca:PEE:StEE, w/w/w).

	TL IM, 100 g	
	8 g/min	13 g/min
25°C Solid(%)	2.68±0.32	0.44±0.03
4°C Solid(%)	18.89±1.69	10.94±1.41
4°C Liquid(%)	62.59±1.16	75.81±2.95
Total	83.93±0.84	87.19±1.51
Loss	16.07±0.84	12.81±1.51

Structured lipids were synthesized at two flow rates (8 and 13 g/min) in a packed-bed reactor with Lipozyme TL IM of 100 g, respectively. The refined structured lipids were fractionated sequentially at 25°C and 4°C.

기질 1:2:6의 몰비율에서는 효소양(150 g, 125 g, 100 g)에 따른 기질 유량(8 g/min, 13 g/min)에 따라 합성한 반응물들을 증류한 후 acetone fractionation을 수행하여 얻어진 수율(yield, %)을 Table 24에 나타내었다. 유량이 8 g/min 일때 효소양 150 g, 125 g, 100 g 으로 반응한 후 분별 후 얻어진 4°C solid 층의 yield(%)는 각각 23.18%, 24.70%, 27.08% 이었다. 또한, 유량이 13 g/min 일때 효소양 150 g, 125 g, 100 g 으로 반응한 후 분별 후 얻어진 4°C solid 층의 yield(%)는 각각 22.0%, 28.9%, 16.28% 이었다. 기질 유량이 낮을수록 25°C solid 분획층의 수율은 높은 경향을 나타내었으며, 기질 유량이 높을수록 4°C liquid 분획층의 수율은 높은 경향을 나타내었다.

Table 24. Yield (%) after solvent fractionation of structured lipids synthesized with substrate molar ratio of 1:2:6 (Ca:PEE:StEE, w/w/w).

	TL IM, 150g		TL IM, 125g		TL IM, 100g	
	8 g/min	13 g/min	8 g/min	13 g/min	8 g/min	13 g/min
25°C Solid(%)	20.73±1.68	5.47±0.78	9.77±0.89	5.08±0.24	6.53±0.42	2.10±0.30
4°C Solid(%)	23.18±1.85	22.00±0.19	24.70±2.20	28.91±0.92	27.08±1.61	16.28±3.16
4°C Liquid(%)	37.11±0.48	51.70±8.12	47.49±4.63	50.56±1.82	34.12±1.42	58.20±7.88
Total	81.02±0.65	79.17±7.53	83.74±1.59	83.90±1.76	80.50±0.43	75.86±12.37
Loss	18.98±0.65	20.83±7.53	16.26±1.59	16.10±1.76	19.50±0.43	24.14±12.37

Structured lipids were synthesized at two flow rates(8 and 13 g/min) in a packed-bed reactor with different amounts(150 g, 125 g and 100 g) of Lipozyme TL IM, respectively. The refined

structured lipids were fractionated sequentially at 25°C and 4°C.

기질 1:3:6의 몰비율에서는 효소양(150 g, 125 g, 100 g)에 따른 기질 유량(8 g/min, 13 g/min)에 따라 합성한 반응물들을 증류한 후 acetone fractionation을 수행한 후 얻어진 수율(yield, %)을 Table 25에 나타내었다. 유량이 8 g/min 일때 효소양 150 g, 125 g, 100 g 으로 반응한 후 분별 후 얻어진 4°C solid 층의 yield(%)는 각각 32.71%, 20.22%, 28.38% 이었다. 또한, 유량이 13 g/min 일 때 효소양 150 g, 125 g, 100 g 으로 반응한 후 분별 후 얻어진 4°C solid 층의 yield(%)는 각각 22.72%, 19.15%, 20.50% 이었다. 기질 1:2:6의 몰비율에서와 마찬가지로 기질 유량이 낮을수록 25°C solid 분획층의 수율은 높은 경향을 나타내었으며, 기질 유량이 높을수록 4°C liquid 분획층의 수율은 높은 경향을 나타내었다.

Table 25. Yield (%) after solvent fractionation of structured lipids synthesized with substrate molar ratio of 1:3:6 (Ca:PEE:StEE, w/w/w).

	TL IM, 150g		TL IM, 125g		TL IM, 100g	
	8 g/min	13 g/min	8 g/min	13 g/min	8 g/min	13 g/min
25°C Solid(%)	23.45±172	10.61±3.91	24.99±5.22	8.89±0.79	4.97±0.40	1.14±0.08
4°C Solid(%)	32.71±5.22	22.72±2.83	20.22±1.59	19.15±3.86	28.38±1.42	20.50±5.88
4°C Liquid(%)	27.31±0.76	47.42±1.48	35.75±3.55	52.44±1.25	44.81±2.23	59.29±0.03
Total	83.48±2.73	80.75±0.41	80.95±7.11	83.33±1.76	70.09±9.20	80.93±5.83
Loss	16.52±2.73	19.25±0.41	19.05±7.11	16.67±1.76	29.91±9.20	19.07±5.83

Structured lipids were synthesized at two flow rates(8 and 13 g/min) in a packed-bed reactor with different amounts(150 g, 125 g and 100 g) of Lipozyme TL IM, respectively. The refined structured lipids were fractionated sequentially at 25°C and 4°C.

나. 효소적 공법(연속식)에 의하여 합성 후 정제(fractionation)한 반응물의 특성연구

연속식 반응기를 통하여 합성한 반응물을 증류하여 ethylester를 제거한 후 얻어진 triacylglycerol(TAG)를 획득한 후 acetone fractionation을 수행하여 얻어진 반응물들의 특성을 다음과 같이 연구하였다.

(1) 분획(acetone fractionation) 한 후 얻어진 반응물의 triacylglycerol 조성

Figure 24에서는 Lipozyme TLIM 효소가 150 g 충전되어 있는 연속식 반응기에서 기질의 몰비율 1:2:6과 1:3:6의 몰비율을 유량(8 g/min, 13 g/min)에 따라 합성한 반응물들을 증류한 후 acetone fractionation을 수행하여 얻어진 코코아버터 유사지들의 triacylglycerol(TAG) 조성에서 POP/POS/SOS의 조성비(area%)를 코코아버터(cocoa butter, CB)의 조성비와 비교하였다. 코코아버터(CB)의 POP/POS/SOS 조성은 각각 10%, 52%, 36% 이었다. 유량이 8

g/min에서 합성한 1:2:6의 몰비율에서는 POP/POS/SOS 조성이 각각 8%, 34%, 52% 이었으며, 1:3:6의 몰비율에서는 POP/POS/SOS 조성이 각각 12%, 43%, 36% 이었다. 또한, 유량이 13 g/min에서 합성한 1:2:6의 몰비율에서는 POP/POS/SOS 조성이 각각 7%, 33%, 50% 이었으며, 1:3:6의 몰비율에서는 POP/POS/SOS 조성이 각각 9%, 42%, 42% 이었다.

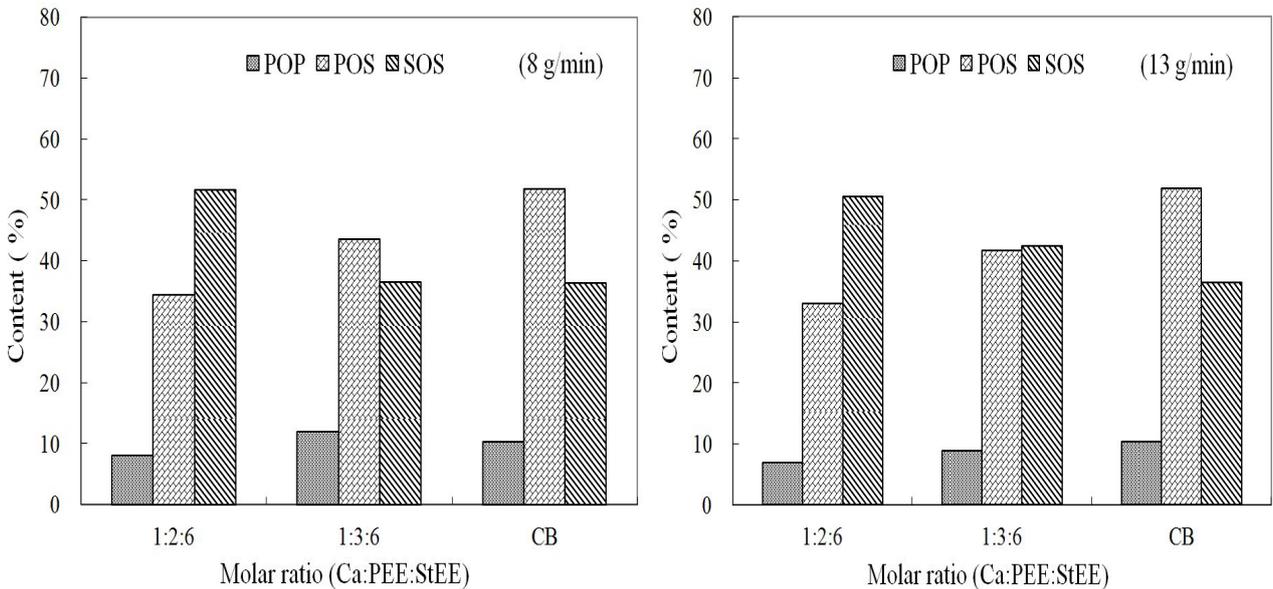


Figure 24. Effect of substrate ratio on POP, POS and SOS formation of fractionated structured lipids synthesized in a packed-bed reactor with 150 g of Lipozyme TL IM. Flow rates were 8 and 13 g/min, respectively. The refined structured lipids were fractionated sequentially at 25°C and 4°C. Symmetrical triacylglycerols (POP, POS, SOS) in cocoa butter (CB) were compared. Abbreviation in TAG species: O: oleic acid; P: palmitic acid; S: stearic acid.

Figure 25에서는 Lipozyme TLIM 효소가 125 g 충전되어 있는 연속식 반응기에서 기질의 몰비율 1:2:6과 1:3:6의 몰비율을 유량(8 g/min, 13 g/min)에 따라 합성한 반응물들을 증류한 후 acetone fractionation을 수행하여 얻어진 코코아버터 유사지들의 TAG 조성에서 POP/POS/SOS의 조성비(area%)를 코코아버터(cocoa butter, CB)의 조성비와 비교하였다. 유량이 8 g/min에서 POP/POS/SOS 조성은 합성한 1:2:6의 몰비율에서 각각 7%, 36%, 53% 이었으며, 1:3:6의 몰비율에서는 각각 9%, 42%, 45% 이었다. 또한, 유량이 13 g/min에서 합성한 1:2:6의 몰비율에서는 POP/POS/SOS 조성이 각각 8%, 35%, 44% 이었으며, 1:3:6의 몰비율에서는 각각 8%, 42%, 45% 이었다.

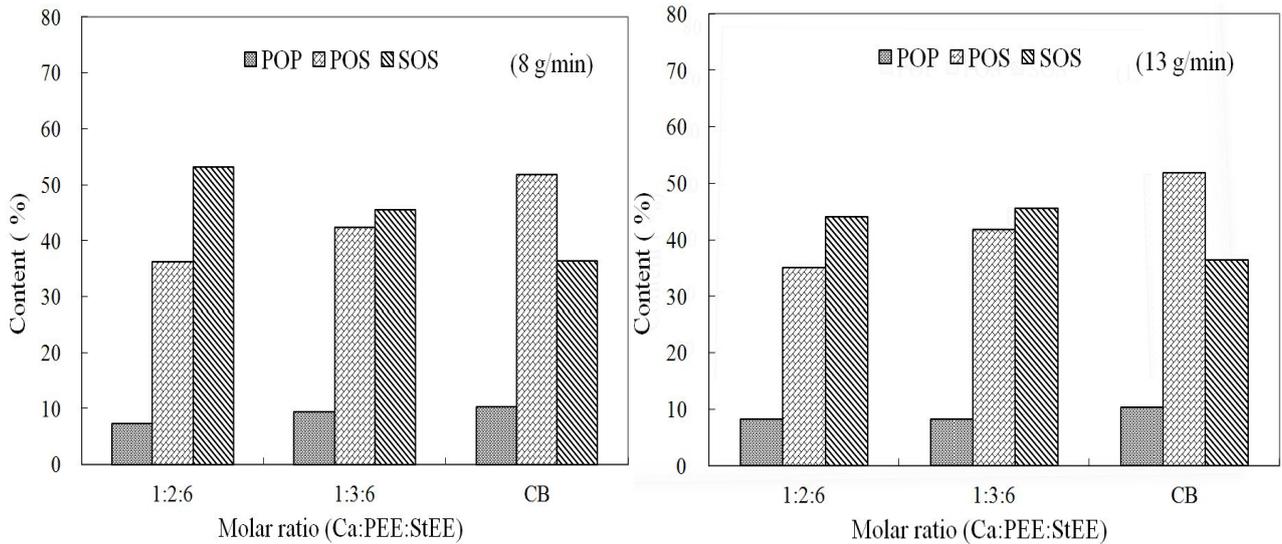


Figure 25. Effect of substrate ratio on POP, POS and SOS formation of fractionated structured lipids synthesized in a packed-bed reactor with 125 g of Lipozyme TL IM. Flow rates were 8 and 13 g/min, respectively. The refined structured lipids were fractionated sequentially at 25°C and 4°C. Symmetrical triacylglycerols (POP, POS, SOS) in cocoa butter (CB) were compared. Abbreviation in TAG species: O: oleic acid; P: palmitic acid; S: stearic acid.

Figure 26에서는 Lipozyme TLIM 효소가 100 g 충전되어 있는 연속식 반응기에서 기질의 몰비율 1:2:4, 1:2:6과 1:3:6의 몰비율을 유량(8 g/min, 13 g/min)에 따라 합성한 반응물들을 증류한 후 acetone fractionation을 수행하여 얻어진 코코아버터 유사지들의 TAG 조성에서 POP/POS/SOS의 조성비(area%)를 코코아버터(cocoa butter, CB)의 조성비와 비교하였다. 유량이 8 g/min에서 POP/POS/SOS 조성이 합성한 1:2:4의 몰비율에서는 각각 6%, 33%, 46% 이었으며, 1:2:6의 몰비율에서는 각각 9%, 36%, 43% 이었으며, 1:3:6의 몰비율에서는 각각 11%, 41%, 33% 이었다. 또한, 유량이 13 g/min에서 POP/POS/SOS 조성이 합성한 1:2:4의 몰비율에서는 각각 4%, 22%, 43% 이었으며, 1:2:6의 몰비율에서는 각각 6%, 30%, 55% 이었으며, 1:3:6의 몰비율에서는 각각 8%, 32%, 39% 이었다.

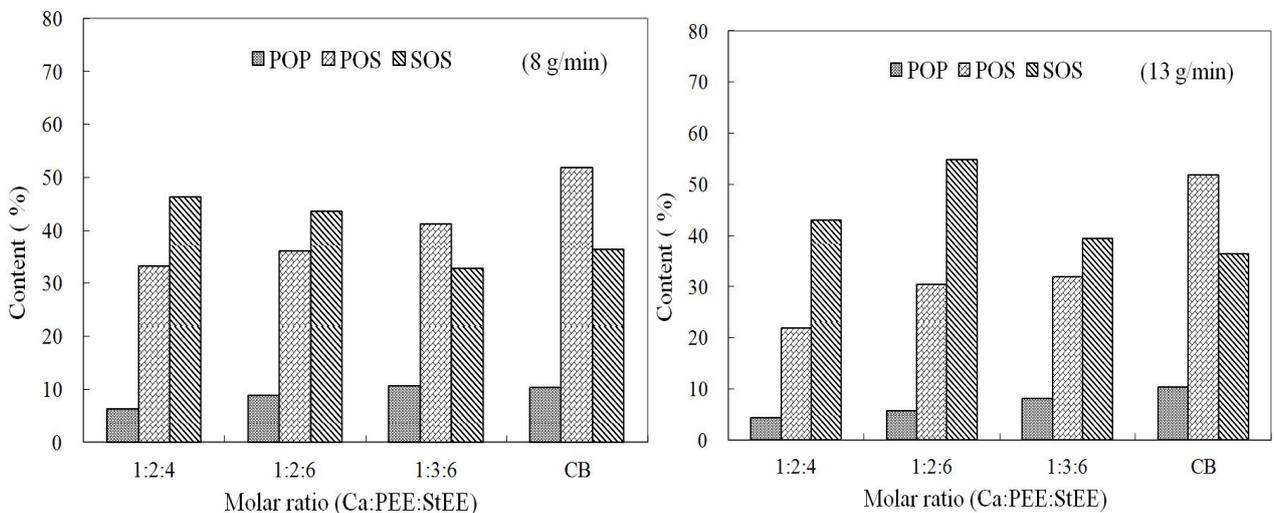


Figure 26. Effect of substrate ratio on POP, POS and SOS formation of fractionated

structured lipids synthesized in a packed-bed reactor with 100 g of Lipozyme TL IM. Flow rates were 8 and 13 g/min, respectively. The refined structured lipids were fractionated sequentially at 25°C and 4°C. Symmetrical triacylglycerols (POP, POS, SOS) in cocoa butter (CB) were compared. Abbreviation in TAG species: O: oleic acid; P: palmitic acid; S: stearic acid.

(2) 분획(acetone fractionation) 한 후 얻어진 반응물의 symmetrical triacylglycerol(TAG) 조성

합성한 반응물을 증류와 분획(acetone fractionation)을 통하여 얻어진 코코아버터 유사자들의 symmetrical TAG 조성을 확인하기 위하여 다음과 같이 분석하였다. 증류와 분획을 수행한 코코아버터 유사지는 기질비율 1:2:4의 100 g 효소반응과 기질비율 1:2:6과 1:3:6의 150 g, 125 g, 100 g의 효소양을 가지고 반응한 반응물들로부터 획득하였다. TAG 조성들은 SMS(Saturated-Monounsaturated-Saturated)와 SSM(Saturated-Saturated-Mono unsaturated)으로 구분하였다. 대표적인 SMS 형태의 TAG에는 코코아버터에서 대부분을 차지하는 SOS(1,3-distearoyl-2-oleoyl glycerol)/POS(1(3)-palmitoyl-3(1)-stearoyl-2-oleoyl glycerol)/POP(1,3-dipalmitoyl-2-oleoyl glycerol) 를 들 수 있다. Figure 27-31 에서는 증류, 분획한 후 얻어진 코코아버터 유사자들의 symmetrical TAG 조성들을 나타내었다.

기질 1:2:4의 몰비율에서는 100 g의 효소에서 8 g/min으로 반응한 후 증류, 분획한 코코아버터 유사지의 SMS 조성은 77% 내외이었으며, SSM은 3% 이었으며, SMM은 5% 내외 이었다. SSM에 대한 SMS의 비율(SSM/SMS ratio)를 계산한 결과, 3.9%이었다(Fig. 27).

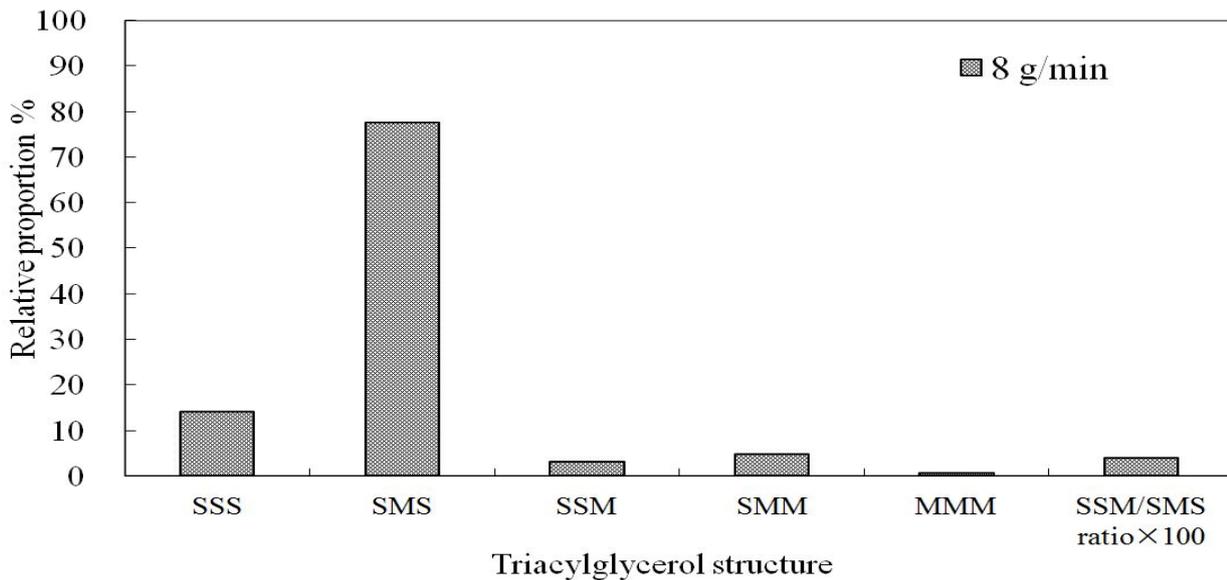


Figure 27. Triacylglycerol structures of structured lipids synthesized using 1:2:4 (Ca: PEE: StEE, w/w/w) substrate ratio in a packed-bed reactor with 100g of Lipozyme TL IM. Flow rate of a packed-bed reactor was 8 g/min. The refined structured lipids were fractionated sequentially at 25°C and 4°C. Abbreviation in TAG structures: S: saturated fatty acids; M: monounsaturated fatty acids(ex. oleic acid).

기질 1:2:6의 몰비율에서는 유량이 8 g/min 일때와 13 g/min 일때의 효소양(150 g, 125 g, 100 g)에 따른 반응물을 증류, 분획(acetone fractionation) 한 후 얻어진 코코아버터 유사자들의 symmetrical TAG조성 변화를 Fig. 28-29에 나타내었다. 기질유량이 8 g/min 일때 효소양 150 g, 125 g, 100 g 일때 SMS의 조성은 각각 84%, 90%, 87% 이었으며, SSM의 조성은 10%, 7%, 5%를 나타내었다(Fig. 28). 또한, SMM의 조성은 각각 2%, 1%, 5% 이었다. SSM/SMS ratio은 150 g, 125 g, 100 g 일때 각각 12.3%, 7.5%, 5.3%를 나타내었다. 기질유량이 13 g/min 일때 효소양 150 g, 125 g, 100 g 일때 SMS의 조성은 각각 85%, 84%, 88% 이었으며, SSM의 조성은 4%, 5%, 2%를 나타내었다(Fig. 29). 이때 SMM의 조성은 각각 3%, 6%, 3% 이었고, SSM/SMS ratio은 150 g, 125 g, 100 g 일때 각각 5.2%, 6.1%, 2.6% 이었다. 기질 유량이 클수록, 그리고 사용된 효소의 양이 작을 수록 SSM/SMS ratio가 낮아지는 경향을 보였다. 이는 곧 acylmigration이 낮아짐을 의미하였다.

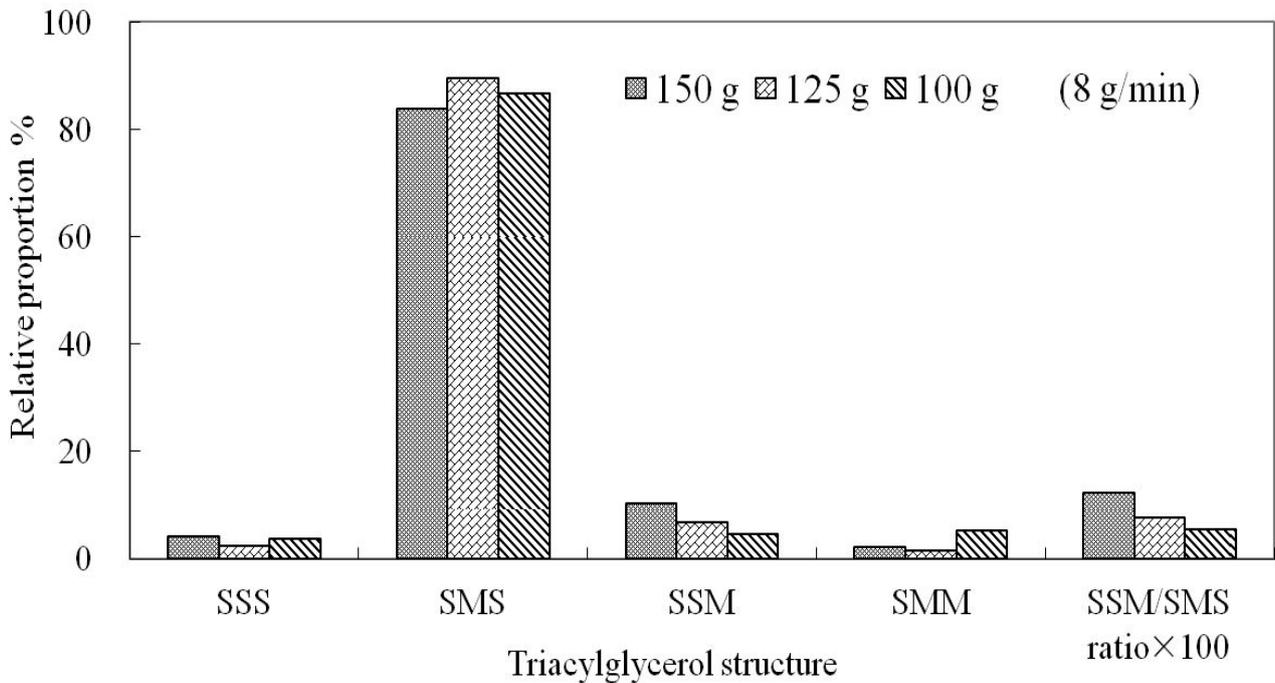


Figure 28. Triacylglycerol structures of structured lipids synthesized using 1:2:6 (Ca: PEE: StEE, w/w/w) substrate ratio in a packed-bed reactor with different Lipozyme TL IM amounts (150, 125g 100g). Flow rate of a packed-bed reactor was 8 g/min. The refined structured lipids were fractionated sequentially at 25°C and 4°C. Abbreviation in TAG structures: S: saturated fatty acids; M: monounsaturated fatty acids(ex. oleic acid).

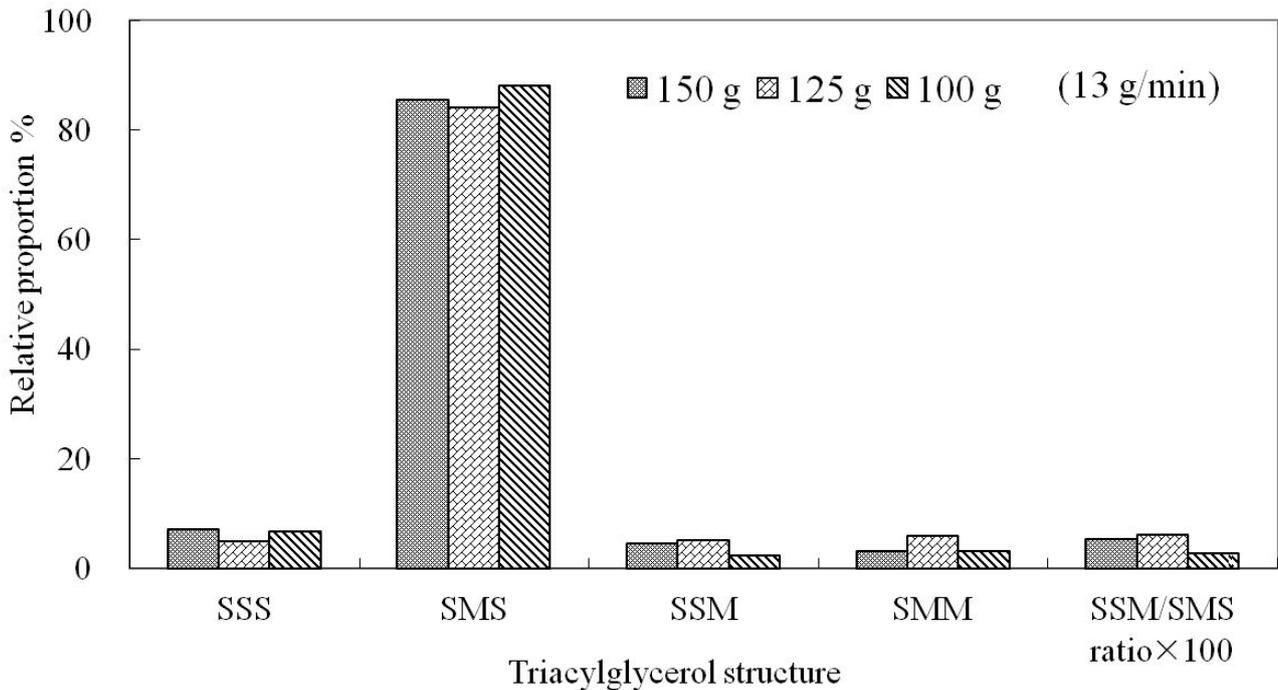


Figure 29. Triacylglycerol structures of structured lipids synthesized using 1:2:6 (Ca: PEE: StEE, w/w/w) substrate ratio in a packed-bed reactor with different Lipozyme TL IM amounts (150, 125g 100g). Flow rate of a packed-bed reactor was 13 g/min. The refined structured lipids were fractionated sequentially at 25°C and 4°C. Abbreviation in TAG structures: S: saturated fatty acids; M: monounsaturated fatty acids(ex. oleic acid).

기질 1:3:6의 몰비율에서는 유량이 8 g/min 일때와 13 g/min 일때의 효소양(150 g, 125 g, 100 g)에 따른 반응물을 증류, 분획(acetone fractionation) 한 후 얻어진 코코아버터 유사자들의 symmetrical TAG조성 변화를 Fig. 30-31에 나타내었다. 기질유량이 8 g/min 일때 효소양 150 g, 125 g, 100 g 일때 SMS의 조성은 각각 89%, 92%, 78% 이었으며, SSM의 조성은 5.2%, 4.6%, 5.5%를 나타내었다(Fig. 30). 또한, SMM의 조성은 각각 3%, 0%, 7% 이었다. SSM/SMS ratio은 150 g, 125 g, 100 g 일때 각각 5.8%, 5.0%, 7.0%를 나타내었다. 기질유량이 13 g/min 일때 효소양 150 g, 125 g, 100 g 일때 SMS의 조성은 각각 90%, 93%, 82% 이었으며, SSM의 조성은 3%, 2%, 3%를 나타내었다(Fig. 31). 이때 SMM의 조성은 각각 3%, 1%, 6% 이었고, SSM/SMS ratio은 150 g, 125 g, 100 g 일때 각각 3.3%, 2.2%, 3.3% 이었다. 1:2:6의 기질비율에서와 마찬가지로 기질 유량이 클수록 SSM/SMS ratio가 낮아지는 경향을 보였으며, 이는 곧 acylmigration이 낮아짐을 의미하였다.

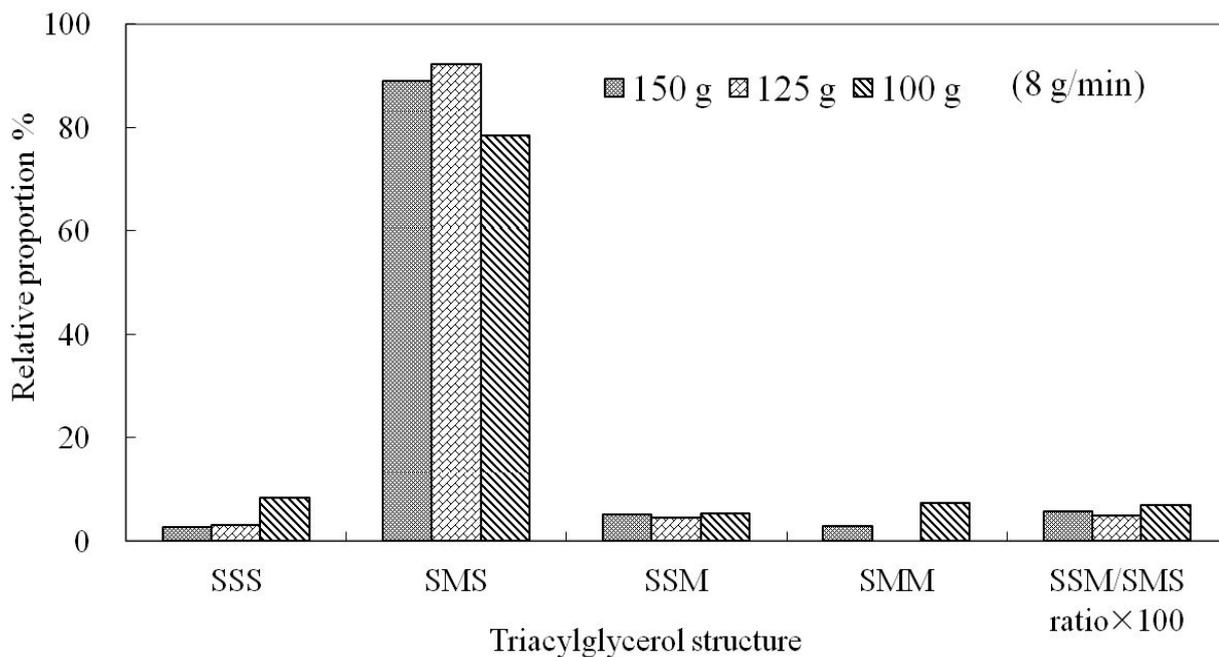


Figure 30. Triacylglycerol structures of structured lipids synthesized using 1:3:6 (Ca: PEE: StEE, w/w/w) substrate ratio in a packed-bed reactor with different Lipozyme TL IM amounts (150, 125g 100g). Flow rate of a packed-bed reactor was 8 g/min. The refined structured lipids were fractionated sequentially at 25°C and 4°C. Abbreviation in TAG structures: S: saturated fatty acids; M: monounsaturated fatty acids(ex. oleic acid).

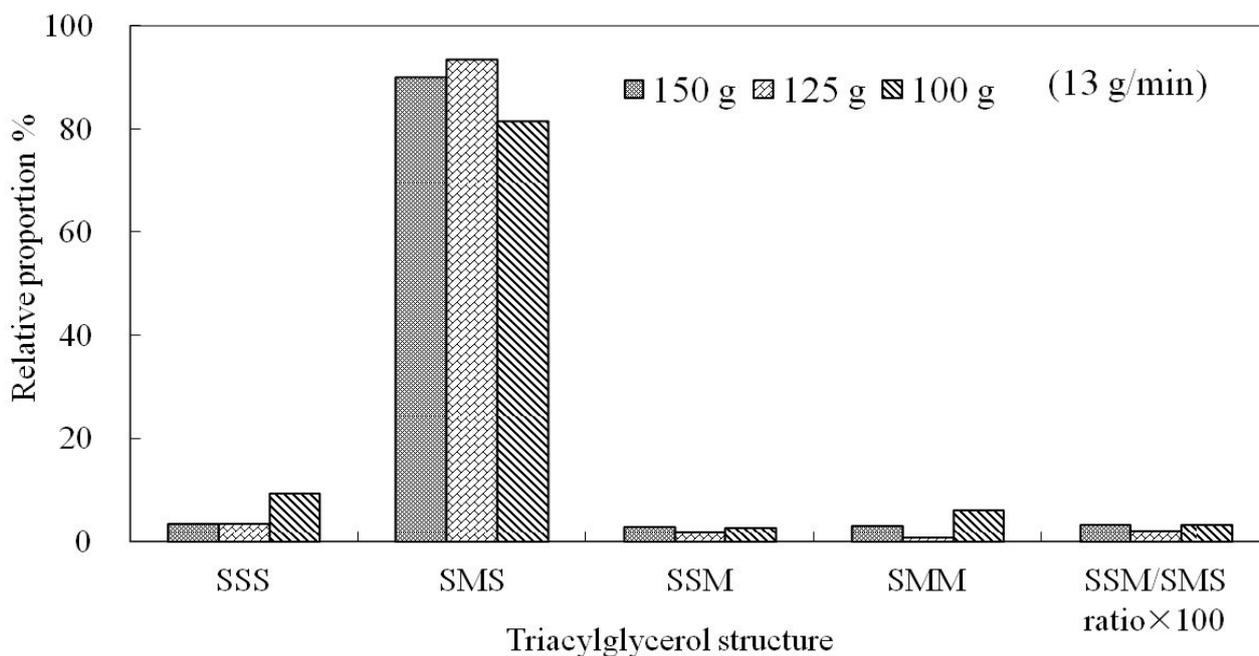


Figure 31. Triacylglycerol structures of structured lipids synthesized using 1:3:6 (Ca: PEE: StEE, w/w/w) substrate ratio in a packed-bed reactor with different Lipozyme TL IM amounts (150, 125g 100g). Flow rate of a packed-bed reactor was 13 g/min. The refined structured lipids were fractionated sequentially at 25°C and 4°C. Abbreviation in TAG structures: S: saturated fatty acids; M: monounsaturated fatty acids(ex. oleic acid).

(3) 분획(acetone fractionation) 한 후 얻어진 반응물의 melting and crystallization behavior 분석

유지의 melting profile과 crystallization profile을 비교하기 위하여 differential scanning calorimetry(DSC) 분석을 수행하였다. 증류와 분획을 수행한 코코아버터 유사지는 기질비율 1:2:4의 100 g 효소반응과 기질비율 1:2:6과 1:3:6의 150 g, 125 g, 100 g의 효소양을 가지고 반응한 반응물들로부터 획득하였다. 합성한 반응물을 증류와 분획(acetone fractionation)을 통하여 얻어진 코코아버터 유사지들의 melting profile과 crystallization profile을 Figure 32-36 에 나타내었다.

100 g의 효소를 가지고 반응한 기질 1:2:4의 몰비율은 각 유량별(8 g/min, 13 g/min)로 melting profile과 crystallization profile을 Figure 32에 나타내었다. Melting profile에서 cocoa butter와는 다르게 45.4°C와 48.2°C에서 endothermic peak를 나타내었다. Crystallization profile에서는 29.3°C와 31.4°C의 exothermic peak를 나타내었다.

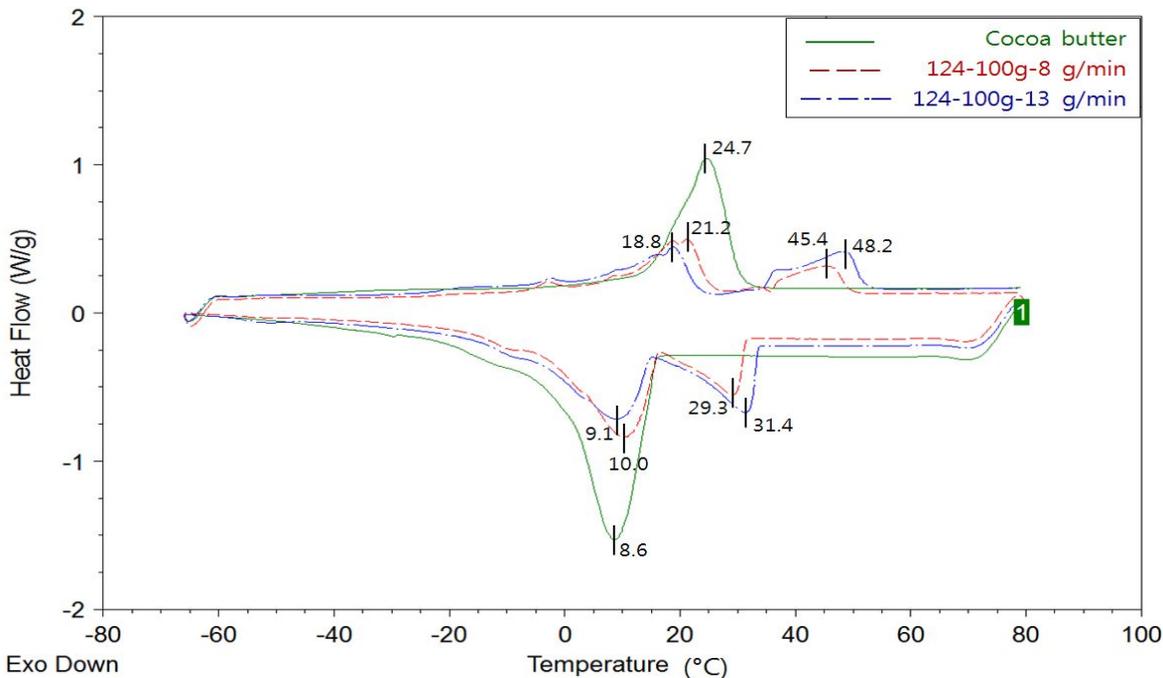


Figure 32. Melting and crystallization thermograms of cocoa butter and structured lipids synthesized using 1:2:4 (Ca: PEE: StEE, w/w/w) substrate ratio in a packed-bed reactor with 100g of Lipozyme TL IM. Flow rate of a packed-bed reactor was 8 g/min and 13 g/min. The refined structured lipids were fractionated sequentially at 25°C and 4°C.

기질 1:2:6의 몰비율로 8 g/min의 기질 유량에서 각 효소양(150 g, 125 g, 100 g)별로 비교한 melting and crystallization profile을 Figure 33에 나타내었다. Melting profile에서 효소양 150 g, 125 g, 100 g일때 각각 endothermic 정점 peak를 23.9°C, 22.6°C, 18.6°C에서 나타내었다. 코코아버터에서는 24.7°C의 endothermic 정점 peak를 보였다. Crystallization profile에서 효소양 150 g, 125 g, 100 g일때 각각 exothermic 정점 peak를 13.5°C, 13.5°C, 10.6°C에서 나타내었다. 코코아버터에서는 8.6°C의 exothermic 정점 peak를 보였다. 기질

1:2:6의 몰비율로 13 g/min의 기질 유량에서 각 효소양(150 g, 125 g, 100 g)별로 비교한 melting and crystallization profile을 Figure 34에 나타내었다. Melting profile에서 효소양 150 g, 125 g, 100 g일때 각각 endothermic 정점 peak를 22.7°C, 21.1°C, 20.0°C에서 나타내었다. Crystallization profile에서 효소양 150 g, 125 g, 100 g일때 각각 exothermic 정점 peak를 12.5°C, 12.2°C, 10.8°C에서 나타내었다.

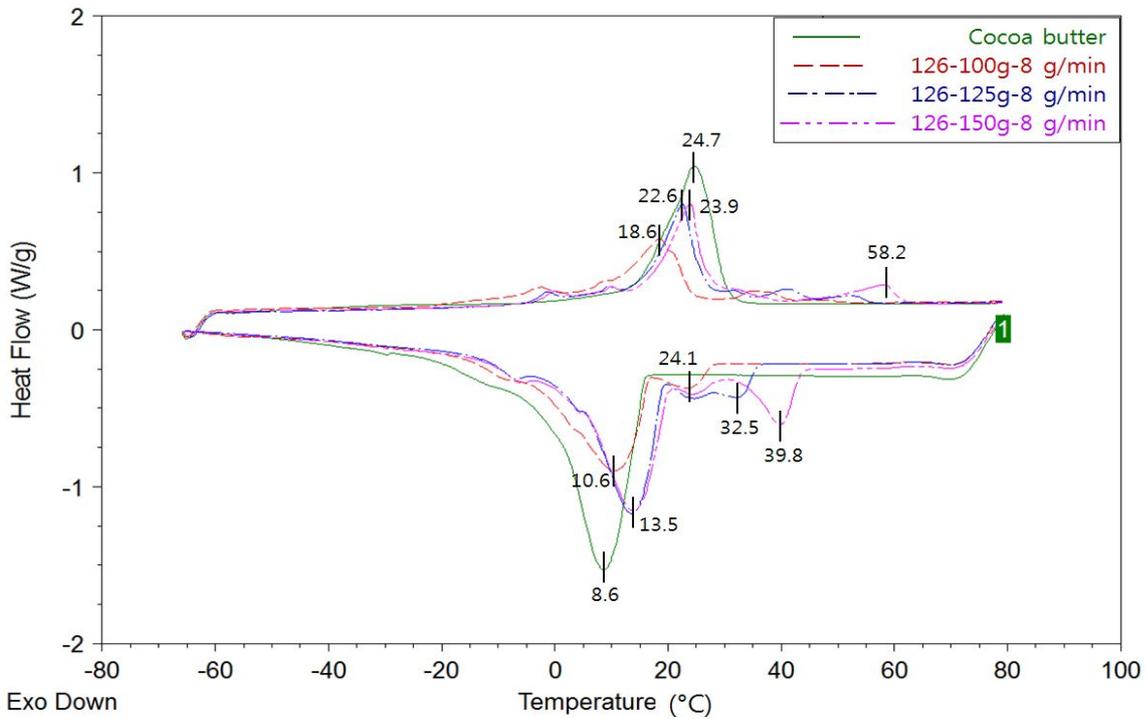


Figure 33. Melting and crystallization thermograms of cocoa butter and structured lipids synthesized using 1:2:6 (Ca: PEE: StEE, w/w/w) substrate ratio in a packed-bed reactor with different amounts (100, 125, 150g) of Lipozyme TL IM. Flow rate of a packed-bed reactor was 8 g/min. The refined structured lipids were fractionated sequentially at 25°C and 4°C.

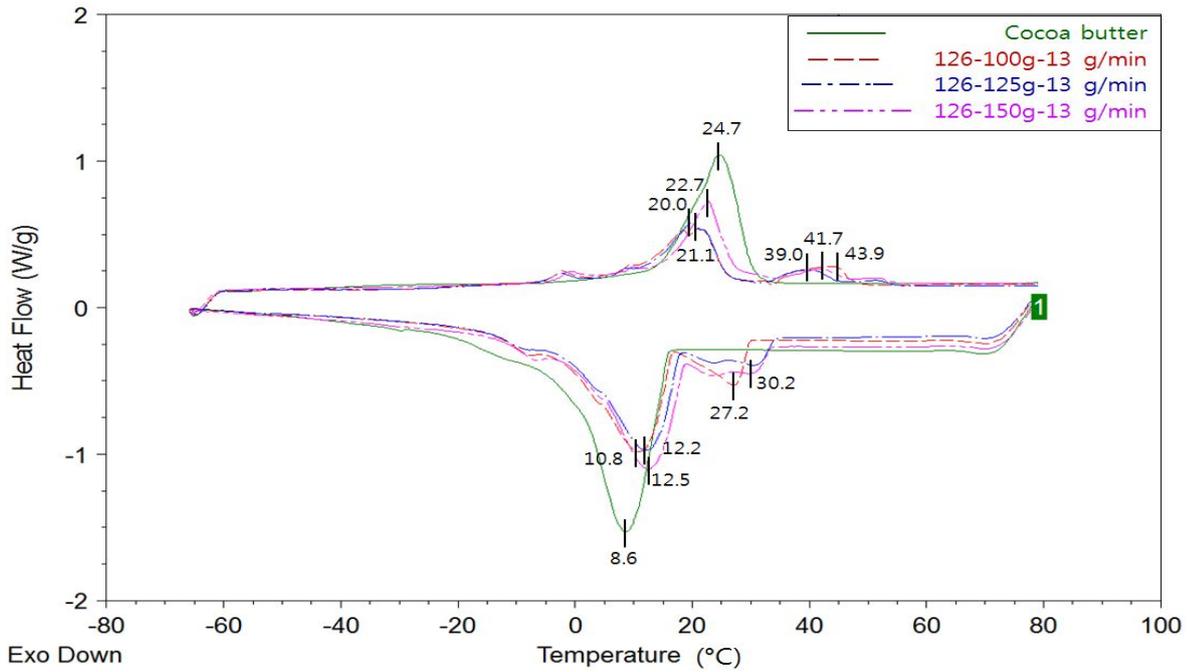


Figure 34. Melting and crystallization thermograms of cocoa butter and structured lipids synthesized using 1:2:6 (Ca: PEE: StEE, w/w/w) substrate ratio in a packed-bed reactor with different amounts (100, 125, 150g) of Lipozyme TL IM. Flow rate of a packed-bed reactor was 13 g/min. The refined structured lipids were fractionated sequentially at 25°C and 4°C.

기질 1:3:6의 몰비율로 8 g/min의 기질 유량에서 각 효소양(150 g, 125 g, 100 g)별로 비교한 melting and crystallization profile을 Figure 35에 나타내었다. Melting profile에서 효소양 150 g, 125 g, 100 g일때 각각 endothermic 정점 peak를 20.7°C, 23.5°C, 20.2°C에서 나타내었다. Crystallization profile에서 효소양 150 g, 125 g, 100 g일때 각각 exothermic 정점 peak를 12.2°C, 14.0°C, 8.7°C에서 나타내었다. 기질 1:3:6의 몰비율로 13 g/min의 기질 유량에서 각 효소양(150 g, 125 g, 100 g)별로 비교한 melting and crystallization profile을 Figure 36에 나타내었다. Melting profile에서 효소양 150 g, 125 g, 100 g일때 각각 endothermic 정점 peak를 21.4°C, 21.8°C, 19.2°C에서 나타내었다. Crystallization profile에서 효소양 150 g, 125 g, 100 g일때 각각 exothermic 정점 peak를 11.2°C, 11.2°C, 9.6°C에서 나타내었다.

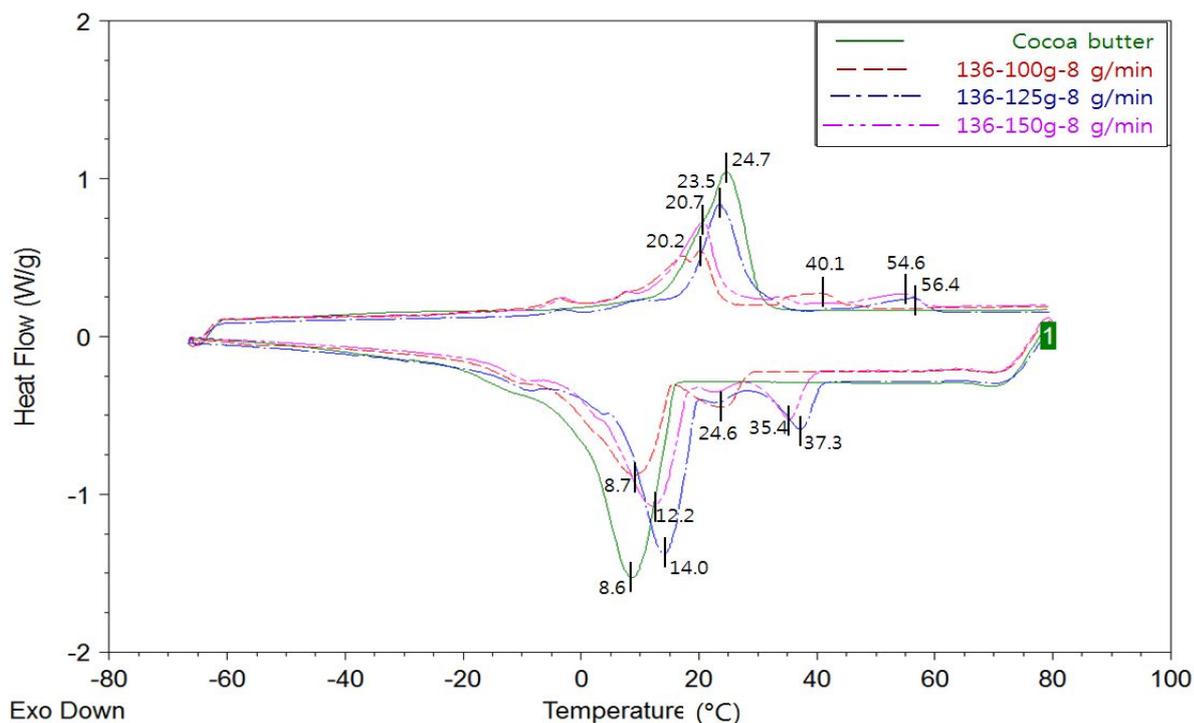


Figure 35. Melting and crystallization thermograms of cocoa butter and structured lipids synthesized using 1:3:6 (Ca: PEE: StEE, w/w/w) substrate ratio in a packed-bed reactor with different amounts (100, 125, 150g) of Lipozyme TL IM. Flow rate of a packed-bed reactor was 8 g/min. The refined structured lipids were fractionated sequentially at 25°C and 4°C.

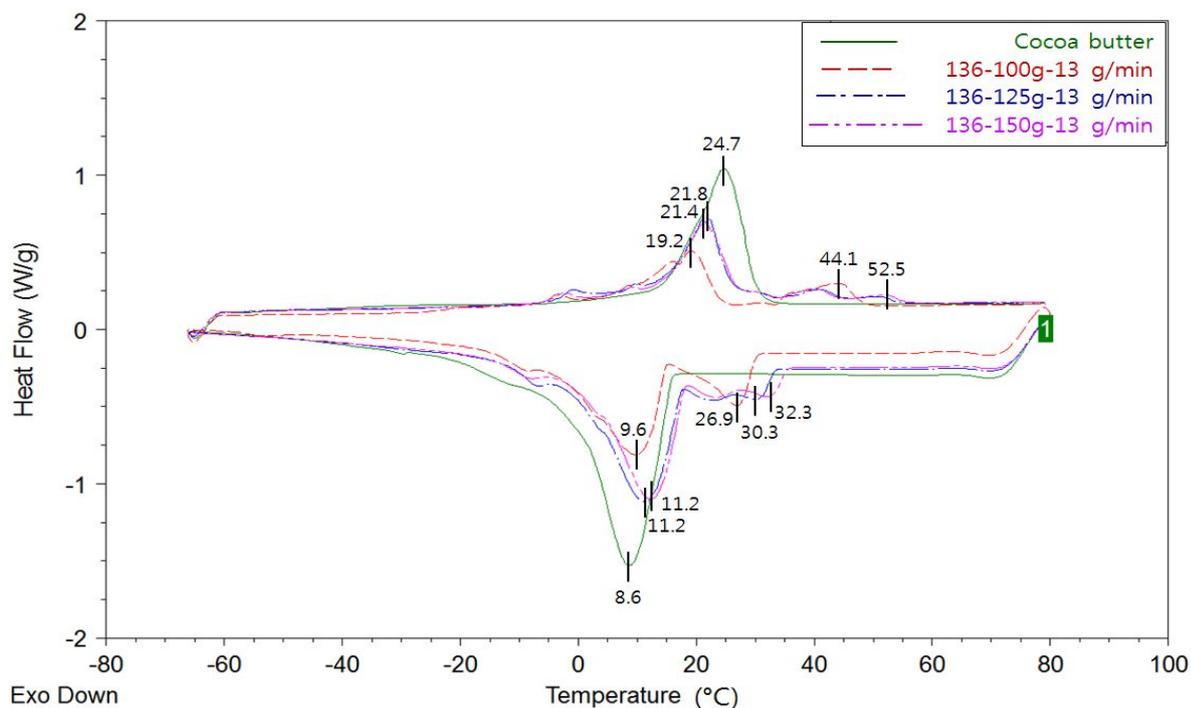


Figure 36. Melting and crystallization thermograms of cocoa butter and structured lipids synthesized using 1:3:6 (Ca: PEE: StEE, w/w/w) substrate ratio in a packed-bed reactor with different amounts (100, 125, 150g) of Lipozyme TL IM. Flow rate of a packed-bed reactor was 13 g/min. The refined structured lipids were fractionated sequentially at 25°C and 4°C.

다. 효소적 공법(연속식)에 의하여 대량합성 후 정제(fractionation)한 반응물의 특성 연구

기질 1:2:2(Ca: PEE: StEE, w/w/w) 몰비율을 Lipozyme TL IM 효소 125 g으로 충전되어 있는 packed-bed reactor에서 코코아버터 대체지의 대량합성을 수행하였다. 이때 packed-bed reactor의 반응온도는 50°C 이었으며, 기질들의 유량은 8 g/min으로 총 기질무게가 대략 15 kg정도를 반응하였다.

(1) 대량 합성한 반응물의 분획을 위한 acetone fractionation 조건 확립

기질의 1:2:2 몰비율로 대량 합성한 반응물에는 다음 Table 26과 같이 다양한 triacylglycerol(TAG) 조성을 나타내고 있었다. 이들의 POP/POS/SOS로 구성된 유지를 얻기 위한 분획 조건을 확립하기 위하여 다양한 조건에서의 yield(%) 및 triacylglycerol 조성을 살펴보았다.

Table 26. Triacylglycerol species and equivalent carbon number (ECN) of scale-up structured lipids synthesized with substrate molar ratio of 1:2:2 (Ca:PEE:StEE, w/w/w).

ECN	TAG species	TL IM, 125 g
		8 g/min
46	LOO	4.89
	LOP	14.31
	PLP/SLP	4.50
48	OOO	5.76
	POO	23.85
	POP	13.36
50	SOO	9.66
	POS	16.65
	PPS	1.36
52	SOS	4.36
	SSP	1.31
54	SSS	-

The scale-up structured lipid was synthesized with substrate molar ratio of 1:2:2 (Ca:PEE:StEE, w/w/w) at flow rate of 8 g/min in a packed-bed reactor with 125 g of Lipozyme TL IM.

대량 합성한 반응물을 25°C와 4°C에서 각각 기존의 방법으로 수행하였을 때, TAG 조성을 나타내는 chromatogram을 Figure 37에 나타내었다. 25°C와 4°C에서 분획한 반응물을 cocoa butter와 비교하였을 때 분획이 완전히 되지 않았음을 확인하였다.

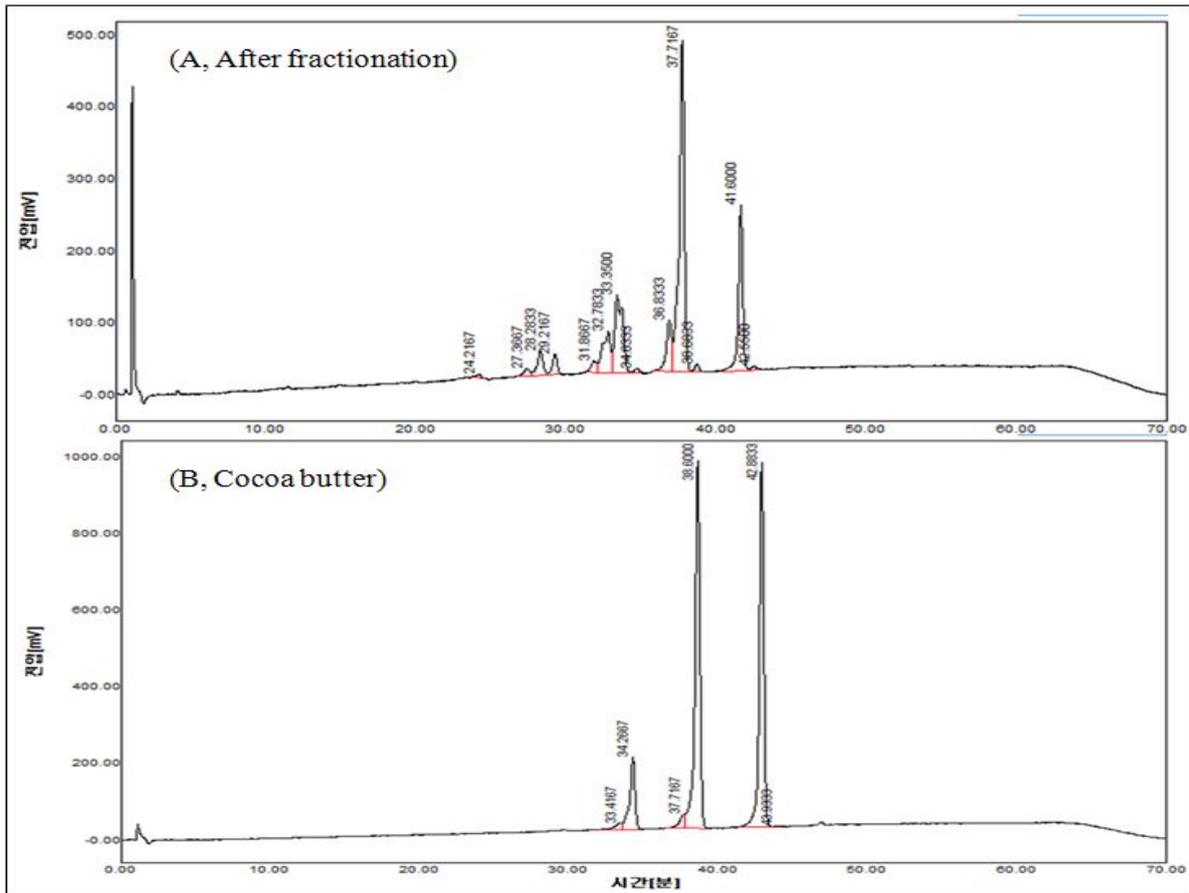


Figure 37. Triacylglycerol chromatogram of the scale-up structured lipid after fractionation (A) and cocoa butter (B). The scale-up structured lipid was synthesized with substrate molar ratio of 1:2:2 (Ca:PEE:StEE, w/w/w) at flow rate of 8 g/min in a packed-bed reactor with 125 g of Lipozyme TL IM. The scale-up structured lipid was fractionated sequentially at 25°C and 4°C.

다음 대량 합성한 반응물을 분획온도를 다르게 하여 분획을 수행하여 Figure 38에 TAG 조성을 나타내었다. Fractionation A에서는 반응물을 25°C와 7°C(two-step fractionation)에서 분획을 수행한 결과이고, fractionation B에서는 반응물을 25°C와 7°C, 4°C(three-step fractionation)에서 분획을 수행한 결과이다. 다음 chromatogram에서 보는바와 같이 fractionation B에서 POP/POS/SOS 의 조성이 코코아버터의 TAG 조성과 유사한 결과를 나타내었다. Fractionation B방법으로 분획한 후 최종 얻어진 yield(%)는 9-11%내외로 비교적 낮은 편이었다.

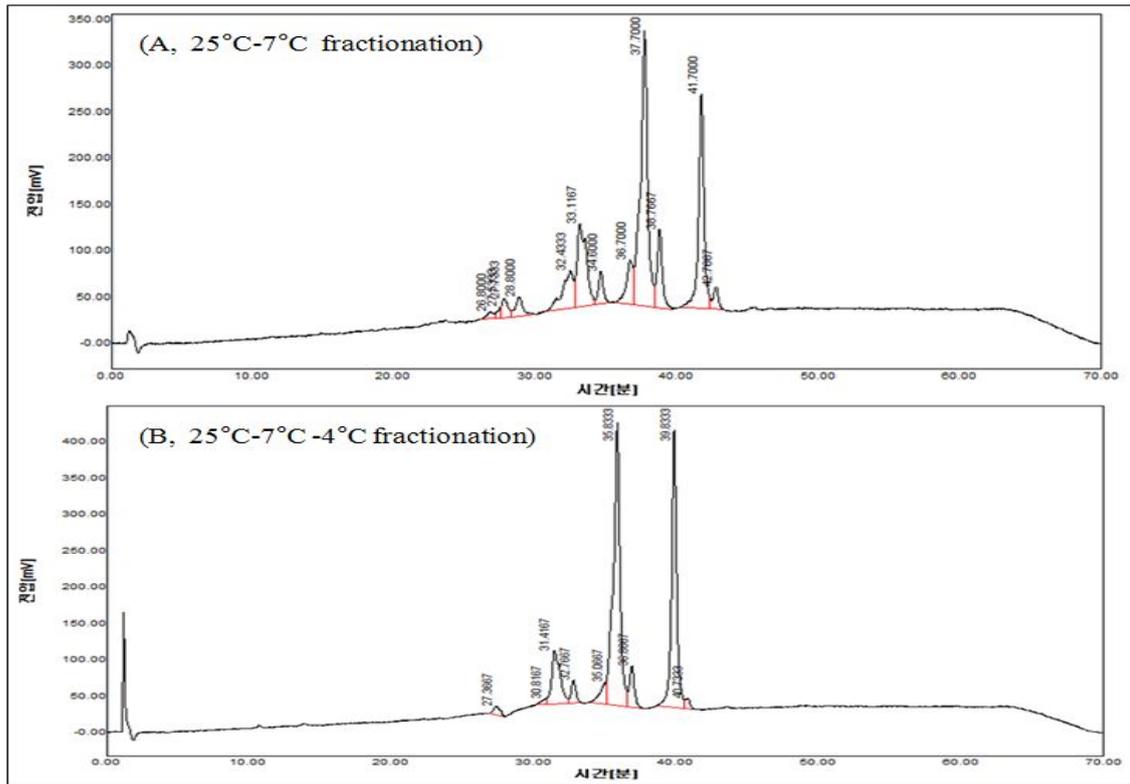


Figure 38. Triacylglycerol chromatogram of the scale-up structured lipids after fractionation (A) and fractionation (B). Fractionation A was carried out sequentially at 25°C and 7°C(A). Fractionation B was carried out sequentially at 25°C, 7°C and 4°C(B).

따라서 수율을 높이기 위하여 반응물을 25°C와 4°C, 6°C(three-step fractionation)에서 분획을 수행한 결과를 Figure 39에 나타내었다. 이때 분별 후에 획득한 코코아버터 유사지의 총 수율은 13-14%내외를 나타내었다.

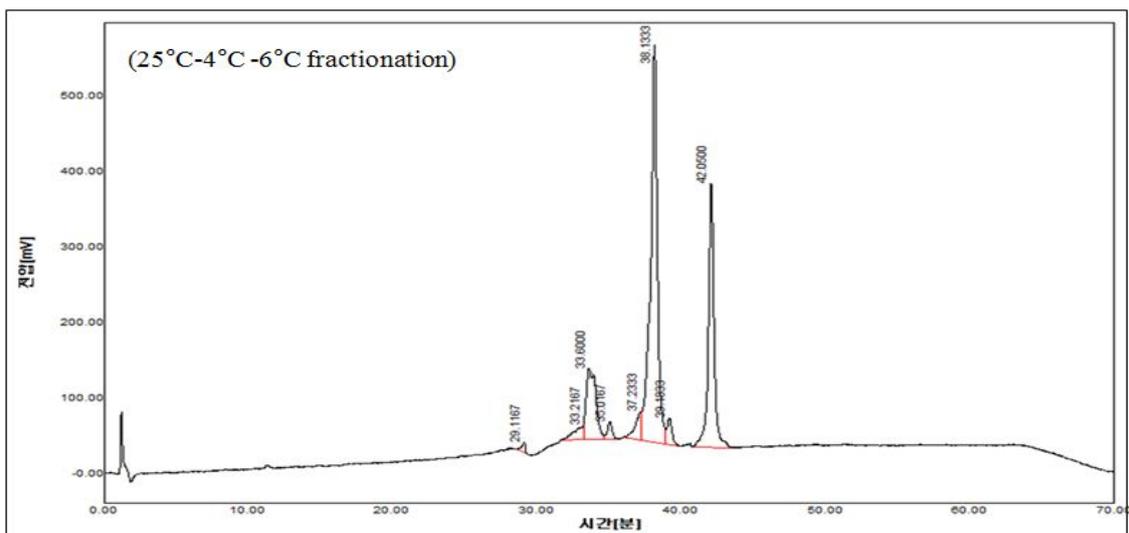


Figure 39. Triacylglycerol chromatogram of the scale-up structured lipids after acetone fractionation. Fractionation was carried out sequentially at 25°C, 4°C and 6°C.

(2) 대량 합성한 반응물을 acetone fractionation 한 후 획득한 코코아버터 유사지의 특성 연구

대량 합성한 반응물 15 kg을 증류를 통하여 ethylester를 제거한 후 얻어진 triacylglycerol 반응물은 대략 6 kg 정도 획득하였다. 이들을 확립된 acetone fractionation을 수행하기 위하여 25℃와 4℃, 6℃(three-step fractionation)에서 대량 스케일로 분획을 수행한 후 정제하여 코코아버터 유사지를 생성하였다. 정제 후 얻어진 코코아버터 유사지는 대략 635 g을 획득하였다. Table 27에서는 대량 합성한 반응물의 분획(acetone fractionation) 하기 전과 분획 후의 TAG 조성 변화를 나타내었다. 분별 후 POP/POS/SOS의 함량이 각각 13.4%, 51.8%, 32.3%를 나타내었다. Figure 40에서는 대량 합성한 반응물의 분별 전(A)과 분별 후(B), 그리고 cocoa butter(C)의 chromatogram을 나타내었다. 분별 후 대량합성 반응물의 TAG 조성은 cocoa butter와 유사함을 확인하였다.

Table 27. Triacylglycerol species and equivalent carbon number (ECN) of the scale-up structured lipid before fractionation and after fractionation.

ECN	TAG species	Scale-up structured lipid	
		Before fractionation	After fractionation
46	LOO	4.89	
	LOP	14.31	
	PLP/SLP	4.50	
48	OOO	5.76	
	POO	23.85	
	POP	13.36	13.4
50	SOO	9.66	
	POS	16.65	51.8
	PPS	1.36	
52	SOS	4.36	32.3
	SSP	1.31	
54	SSS	-	-

The scale-up structured lipid was synthesized with substrate molar ratio of 1:2:2 (Ca:PEE:StEE, w/w/w) at flow rate of 8 g/min in a packed-bed reactor with 125 g of Lipozyme TL IM. The scale-up structured lipid was fractionated sequentially at 25℃, 4℃ and 6℃ by a three-step process. Abbreviation in TAG species: L: linoleic acid; O: oleic acid; P: palmitic acid; S: stearic acid.

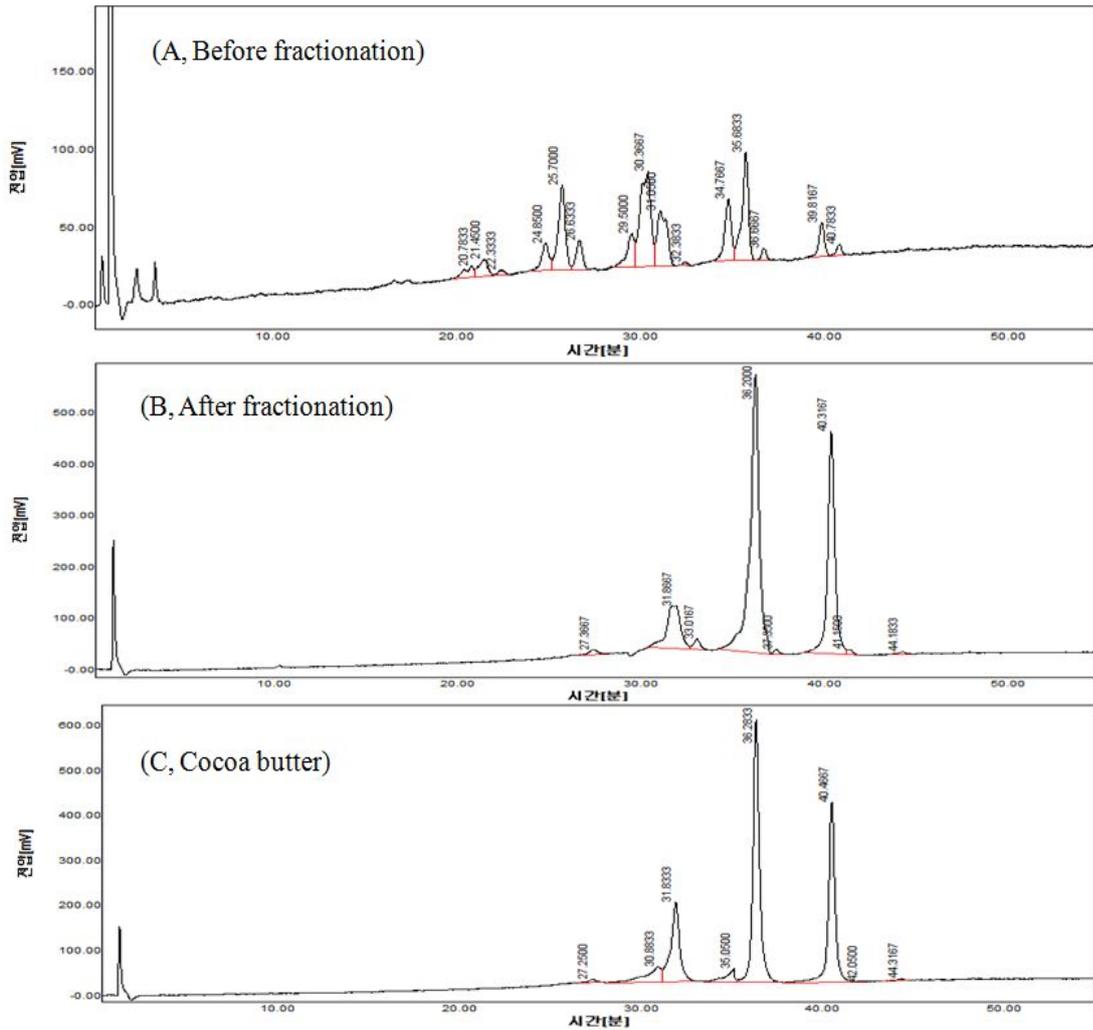


Figure 40. Triacylglycerol chromatogram of cocoa butter (C) and the scale-up structured lipids before fractionation (A) and after fractionation (B). The scale-up structured lipid was synthesized with substrate molar ratio of 1:2:2 (Ca:PEE:StEE, w/w/w) at flow rate of 8 g/min in a packed-bed reactor with 125 g of Lipozyme TL IM. The scale-up structured lipid was fractionated sequentially at 25°C, 4°C and 6°C by a three-step process.

Table 28에서는 대량 합성한 반응물의 분획(acetone fractionation)한 후의 지방산 조성을 나타내었다. 분별 후 palmitic acid, stearic acid, oleic acid의 함량은 각각 21.82%, 42.23%, 42.23% 이었다.

Table 28. Fatty acid composition of the scale-up structured lipid after a three-step fractionation

Fatty acids	Scale-up structured lipid	Cocoa butter
C16:0(P)	21.82	25.38
C18:0(S)	42.23	37.83
C18:1(O)	42.23	33.03
C18:2(L)	3.72	2.70
C18:3n3(Ln)	1.25	1.07
P+S <sup>1)</sup>	64.05	63.21

The scale-up structured lipid was synthesized with substrate molar ratio of 1:2:2 (Ca:PEE:StEE, w/w/w) at flow rate of 8 g/min in a packed-bed reactor with 125 g of Lipozyme TL IM. The scale-up structured lipid was fractionated sequentially at 25°C, 4°C and 6°C by a three-step process.

<sup>1)</sup> P+S : Sum of palmitic acid (P) and stearic acid (S).

Figure 41에서는 대량 합성한 반응물의 분획(acetone fractionation)한 후의 melting profile 과 crystallization profile을 나타내었다. 분별 후 melting profile에서 endothermic 정점 peak를 24.5°C로 cocoa butter의 24.7°C와 유사하였다. Crystallization profile에서 분별 후 exothermic 정점 peak를 10.5°C에서 나타내었으며, cocoa butter는 8.6°C 이었다.

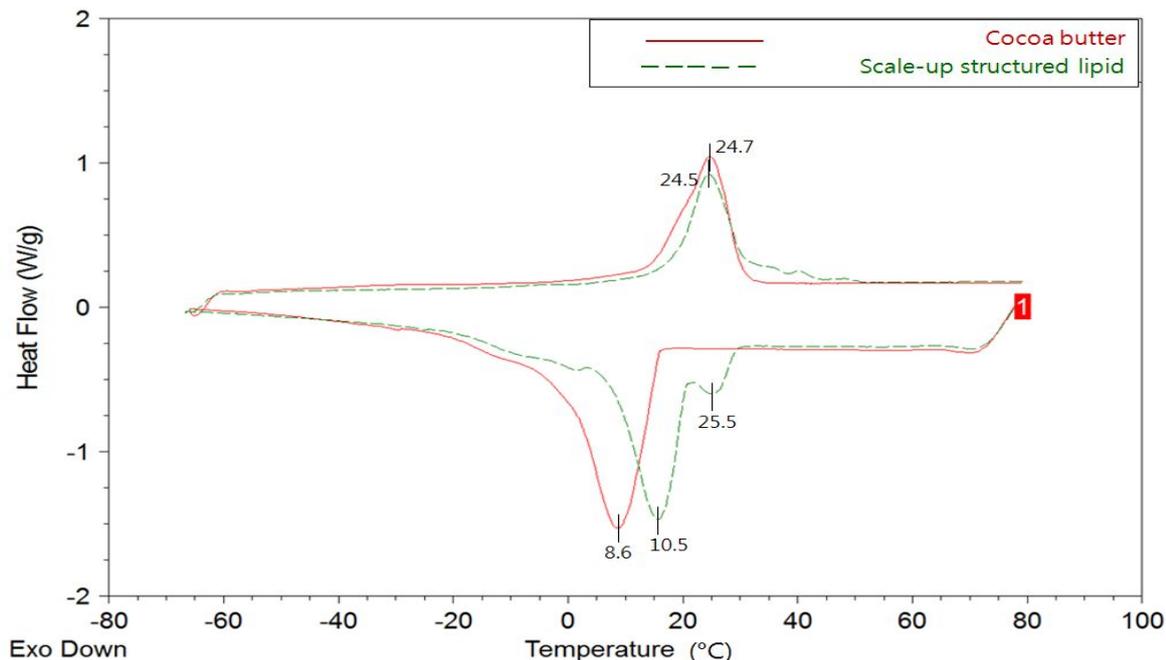
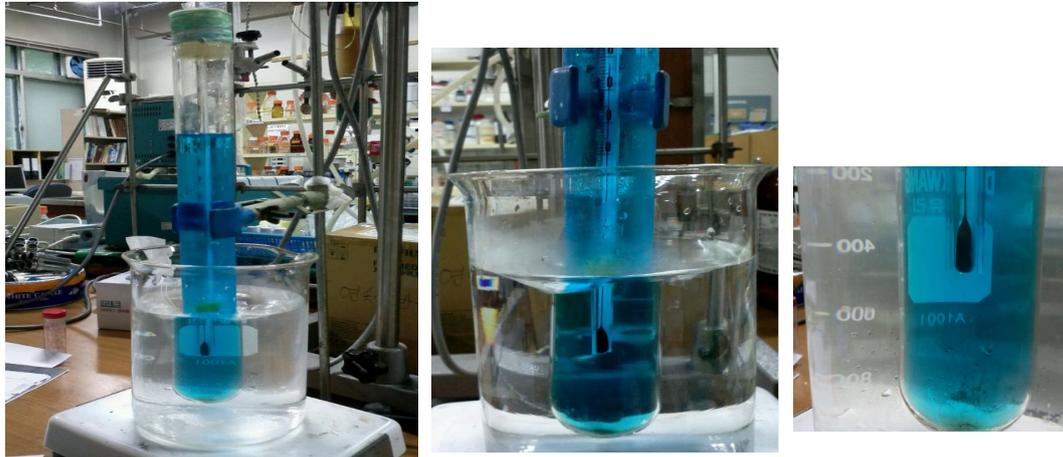


Figure 41. Melting and crystallization thermograms of cocoa butter and the scale-up structured lipid after a three-step fractionation. The scale-up structured lipid was synthesized with substrate molar ratio of 1:2:2 (Ca:PEE:StEE, w/w/w) at flow rate of 8 g/min in a packed-bed reactor with 125 g of Lipozyme TL IM. The scale-up structured lipid was fractionated sequentially at 25°C, 4°C and 6°C by a three-step process.

이렇게 1:2:2의 기질 몰비율을 가지고 대량 합성(대략 15kg)한 후 정제, 분별된 코코아버터 유사지의 물리화학적 특성이 조사하였으며, 이를 이용하여 협동연구기관에서 초콜릿을 제조하였다. 한편, 최종 결과물을 상업적인 회사에서 사용하는 녹는점을 측정하는 방법을 이용하여 분석하여 보았다(Capillary 관을 이용한 melting point 측정, Table 29).



<Capillary 관을 이용한 melting point 측정>

Table 29. Solid fat index of the scale-up structured lipid after a three-step fractionation

Temperature (°C)	Scale-up structured lipid	Cocoa butter
10	96.9	94.6
15	93.1	89.0
20	82.7	67.5
25	47.6	21.5
30	18.5	0.7
35	9.8	0.0
40	4.6	0.0
45	1.6	0.0
50	0.1	0.0
Melting point (°C)	42	30

The scale-up structured lipid was synthesized with substrate molar ratio of 1:2:2 (Ca:PEE:StEE, w/w/w) at flow rate of 8 g/min in a packed-bed reactor with 125 g of Lipozyme TL IM. The scale-up structured lipid was fractionated sequentially at 25°C, 4°C and 6°C by a three-step process.

위에서 보듯이 분석에 사용된 천연코코아버터의 융점은 30°C로서 통상적인 융점보다 낮았고, 결과물의 융점은 이보다는 비교적 높은 융점을 보였다. 이들 결과물은 초콜릿 제조시 palm mid fraction과 같은 다른 유지와 혼합하면서 융점을 조절할 수 있을 것으로 생각된다. 따라서 초콜릿 가공시 본 결과물은 현재 사용되는 초콜릿 대용유지를 이용한 초콜릿 제조 공정조건에서도 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

## 2. 용매(아세톤)를 이용한 TAG의 대량 분획법 확립 및 초콜릿 제조(제1협동과제)

### 가. 용매(아세톤)를 이용한 TAG의 대량 분획법 확립

고진공 박막 증류로부터 성공적으로 분리된 TAG 화합물로부터 cocoa butter equivalent(CBE) 화합물을 분리하기 위해서 아세톤을 용매로 사용하여 세 단계 온도에서 분별 결정화를 실시하였다. 이를 위하여 온도 자동 조절 장치가 있는 50 Liter급 시 생산 반응기를 사용하였다. 우선 5.1 kg의 TFE장치로부터 분리된 TAG 혼합물을 40 kg의 40℃ 아세톤에 완전히 녹인 다음, 25℃로 냉각시킨 후 20시간 동안 서서히 교반하였다. 20시간 후 생성된 결정은 필터하여 고형분을 제거하고 여액은 다시 반응기에 부어 넣었다. 2차 분별 결정화를 위하여 여액은 40℃ 까지 가열한 후 4℃에서 약 20 시간동안 느리게 교반하여 2차 결정화를 실시하였다. 2차 결정화에서 다시 필터를 통해 여액을 제거하고 고형분에 아세톤 15 kg을 투입하여 6℃에서 약 20시간 동안 느리게 교반하여 3차 결정화를 실시하였다. 20시간 후 생성된 결정은 여과하여 고형분(대략 635 g)을 얻었다. 이 고형분으로부터 잔류 용매를 제거하고 탈산 탈취작업을 통해 CBE 시제품을 생산하였다.

다음 그림 42은 분별결정화 장치이고, 그림 43은 결정이 생성 후 반응기 내부와 결정을 여과하는 과정을 나타내었다. 그림 44는 분별결정화의 공정도이다.



그림 42. 50 Liter 저온 분별 결정화 반응기 사진(저온 분별화 장치 : 한국 화학연구원)



그림 43. 결정이 생성 후 반응기 내부와 결정을 여과하는 과정

따라서 반응물 5.1 kg (원료 INPUT)을 위의 조건에서 세 단계에 걸친 분별결정을 통하여 코코아버터를 대체할 수 있는 생산물(635 g)을 분리하였고, 이때 획득한 POP/POS/SOS 혼합물의 중량 수율은 12.4% 이었다. 분별결정 단계에서 획득한 부산물들은 반응기질로 재사용 되거나 또는 다양한 용도에 맞게 사용될 수 있음.

# 분별 결정화를 통한 CBE 분리공정도

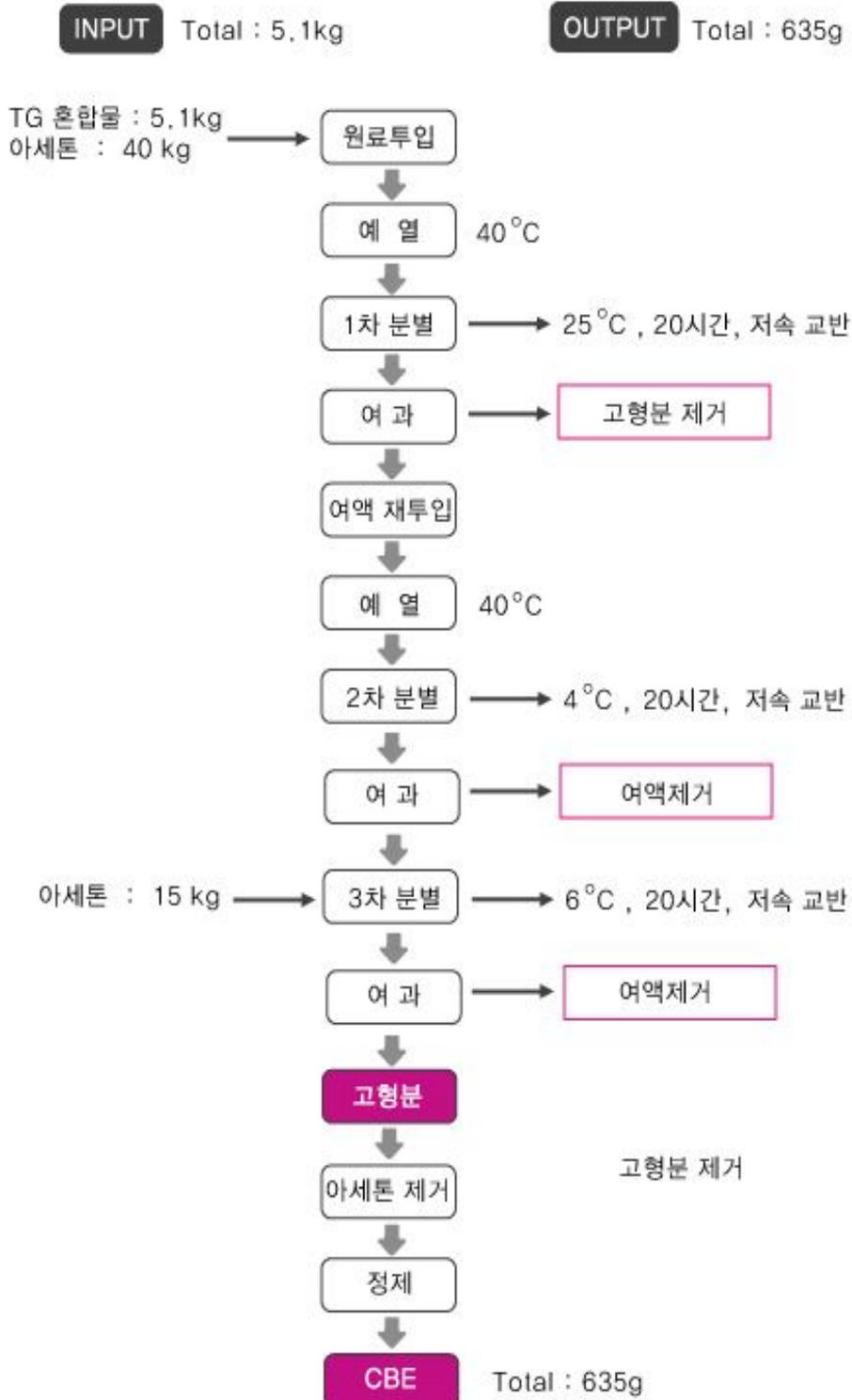


그림 44. 분별결정화 공정도

나. 용매(아세톤)를 이용한 TAG의 대량 분획법 확립결과 요약

[ 50 Liter 급 용매(아세톤)를 이용한 TG의 대량 분획법]

설비명	정제조건	결 과	비고
50 L Glass Reactor	1차 분획 : 25℃ (기질:아세톤=5.1 kg:40 kg) 2차 분획 : 4℃ (여액 저온 분획) 3차분획 : 6℃	원료량 : 5.1 kg 용매 : 40 kg CBE : 635 g	초콜릿 샘플제조

다. 대량 합성 후 얻어진 코코아버터 유사지를 이용한 초콜릿 제조

대량 합성후 정제한 코코아버터 유사지 대략 635 g을 가지고 초콜릿(화이트 초콜릿, 다크 초콜릿, 밀크 초콜릿) 3종을 제조하였다. 각 제조된 초콜릿의 배합비율은 Table 30에서와 같이 수행하였다.

Table 30. Mixing ratio for chocolate preparation

Chocolate	Artificial cocoa butter	Sugar	Cocoa	Skim milk powder	기타
Dark	16	35	45	0	4
Milk	25	35	25	15	-
White	35	35	0	25	5

제조한 3종의 초콜릿(밀크 초콜릿, 화이트 초콜릿, 다크 초콜릿)을 Figure 45-47에 나타내었다. 그림에서와 보는 바와 같이 초콜릿을 제조하였다.



Figure 45. Milk chocolate prepared using synthesized artificial cocoa butter.



Figure 46. White chocolate prepared using synthesized artificial cocoa butter.



Figure 47. Dark chocolate prepared using synthesized artificial cocoa butter.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절 연구개발의 목표와 내용

본 연구과제의 최종 목표는 커져가는 초콜릿 시장에서 천연물인 코코아버터를 대체할 수 있는 인조 코코아버터(*artificial cocoa butter*)를 구성하는 POS (1-palmitoyl-2-oleoyl-3-stearoyl-*sn*-glycerol)와 SOS(1,3-distearoyl-2-oleoyl-*sn*-glycerol) 합성을 위한 최적 조건을 확립하고자 하였다. 또한, 유자원의 활용에 따른 농가의 소득 증대와 합성한 POS와 SOS를 이용하여 *artificial cocoa butter*를 생산함으로써 효소공정에 의한 기술력을 확보하여 국내 제조업체의 경쟁력을 높이며, 수출력을 증대하는 것이 최종 목표이다.

#### 1. 제 1 세부 연구기관

본 연구자는 인조 코코아버터(*artificial cocoa butter*)의 구성원료인 POS (1-palmitoyl-2-oleoyl-3-stearoyl-*sn*-glycerol)/SOS(1,3-distearoyl-2-oleoyl-*sn*-glycerol) 합성을 위한 최적 반응 조건 확립(효소적 공법)과 분석방법 확립, 이를 정제하기 위한 분획(solvent fractionation)조건 확립, 마지막으로 *artificial cocoa butter* 제조를 통한 물성 규명을 함으로써 기업체에서 필요한 핵심기술력을 이전하는 것을 최종 목표로 하였다.

- 효소적 공법에 의한 POS/SOS 합성 최적화 조건 확립(회분식) 및 특성 연구
  - 카놀라유의 반응 표면 분석을 통한 코코아버터 유사 재구성지질 합성 최적화 연구 (기질비율, 효소양, 반응시간)
  - Camellia oil의 반응 표면 분석을 통한 코코아버터 유사 재구성지질 합성 최적화 연구(기질비율, 효소양, 반응시간)
- 효소적 공법에 의한 POS/SOS 합성 최적화 조건 확립(연속식)
  - 연속식 반응기(packed-bed reactor)를 이용한 코코아버터 유사지의 효소적 합성 연구(효소양, 기질유량, 기질 몰비율)
  - 연속식 반응기에서 합성한 반응물의 triacylglycerol(TAG) 조성, 지방산 조성, symmetrical TAG 조성 분석
- 효소적 공법(연속식)에 의하여 합성한 반응물의 정제법(fractionation), 물리화학적 특성 연구
  - 효소적 공법(연속식)에 의하여 합성한 반응물의 fractionation 수행 및 수율(yield, %)
  - 효소적 공법(연속식)에 의하여 합성 후 정제(fractionation)한 반응물의 특성연구

## 2. 제 1 협동 연구기관

본 연구자는 유지분야 사업에 종사하며 유지의 정제 관련한 우수한 기술력을 보유하고 있다. 대량 합성한 반응물의 정제 및 실험실 Scale의 합성을 기업화하기 위한 분획(fractionation) 등을 수행하는 것을 최종 목표로 하였다.

- 팔미트산/스테아린산 에틸에스테르(palmitic/stearic ethylester) 대량합성 및 정제법 확립
  - 팔미트산 에틸에스테르의 대량합성
  - 스테아린산 에틸에스테르의 대량합성
  
- 효소적 공법에 의한 회분식 에스테르 교차 대량 합성 및 고진공 박막 증류 장치(TFE, High Vacuum Thin Film Evaporator)를 이용한 TAG/Ethylester의 분리
  - 효소법에 의한 회분식 에스테르 교차 대량합성
  - 고진공 박막 증류 장치(TFE, High Vacuum Thin Film Evaporator)를 이용한 TAG/Ethylester의 분리
  
- 용매(아세톤)를 이용한 TAG의 대량 분획법 확립 및 초콜릿 제조
  - 용매(아세톤)를 이용한 TAG의 대량 분획법 확립
  - 대량합성 후 얻어진 코코아버터 유사지를 이용한 초콜릿제조

## 제 2 절 연차별 연구개발 목표와 수행내용 그리고 달성도

### 1. 1차년도(2009)

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 연도 (2009)	효소적 공법에 의한 POS/SOS 합성 최적화 조건확립 및 특성 구명 (제1세부)	○ Artificial cocoa butter생성을 위한 기질 정제 및 문헌조사	100%	- Artificial cocoa butter 합성을 위한 기질조사
		○ POS/SOS합성을 위한 최적조건 확립(shaking water bath)	100%	- 기질의 몰비율, 반응온도, 효소 activity, acyl migration 정도확인 및 조건 확립 - rp-HPLC(TAG 조성분석), GC(지방산조성분석), 융점측정 등 분석조건 확립 및 반응정도 구명
		○ 효소적 공법에 의한 POS/SOS의 대량합성(회분식 반응) 및 정제법 확립	100%	- 1L 용량의 회분식 반응기 (Stirred-batch type reactor)에서의 합성 및 반응정도 구명 - 반응부산물의 제거를 위한 정제법 확립
		○ 정제한 POS/SOS의 물리화학적 특성 구명	100%	- 정제한 POS/SOS의 물리적·화학적 특성(융점 분석, solid fat content, TAG 조성 등) 구명
	산업화를 위한 Stearic/Palmitic ethylester 합성 및 정제법 확립 (제1협동)	○ Artificial cocoa butter 생성을 위한 기질합성 기술 개발	100%	- 에스테르류(stearic ethyl ester, palmitic ethyl ester)의 합성 및 정제법 개발완료
		○ Artificial cocoa butter 생성을 위한 기질 정제 기술개발	100%	- 산가조절 및 수분 제어 기술 개발완료

## 2. 2차년도(2010)

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
2차 연도 (2010)	○ 효소적 공법에 의한 POS/SOS 합성 최적화 조건 확립 및 특성구명 (연속식)(제1세부)	○ POS/SOS합성을 위한 최적조건 확립(연속식 반응)	100%	- 고정화 효소가 충전되어 있는 반응기에서의 최적 반응조건 연구 (기질의 유량, 기질의 몰비율 확인 등) -rp-HPLC(TAG 조성분석), GC(지방산조성분석), 융점측정 등 분석조건 확립 및 반응정도 구명
		○ 효소적 공법에 의한 POS/SOS의 대량합성(연속식 반응)	90%	- 연속식 반응기(Continuous packed-bed reactor)에서의 합성 및 반응정도 구명 - 반응부산물의 생성정도 확인
		○ 효소적 공법에 의한 POS/SOS의 회분식 대량합성 산업화 연구	100%	- 산업화 스케일의 대량합성 연구 및 정제방안 연구
	○ 효소적 공법에 의한 합성물의 정제 기술개발 (실험실규모 : 1 LITER) (제1협동)	○ 고진공 증류법 TEST ○ Thin Film 증류법 TEST ○ 최적 증류정제법 개발	100%	- 고진공 증류법 TEST - Thin Film 증류법 TEST - 최적 증류정제법 개발
		○ 최적조건 확립(수율 90%)	100%	- 진공도/온도 조건 확립
	○ 효소적 공법에 의한 합성물의 대량 생산기술개발 (제1협동)	○ 최적조건 확인 및 대량생산 기술 확인	100%	- 생산기술확립(기초설계) - Pilot 설비 자체 확보
○ 100 kg 대량생산		100%	- Pilot에서 시생산 100kg	

### 3. 3차년도(2011)

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
3차 연도 (2011)	○ POS/SOS 합성 반응물의 정제 및 물리적 화학적 특성구명 (제1세부)	○ 합성한 반응물로부터 POS/SOS만 농축하기 위하여 solvent fractionation 조건 확립	100%	- Acetone fractionation 수행 (각 반응물의 온도에 따른 fractionation 수행후의 yield 측정) - rp-HPLC(TAG 조성분석)
		○ 정제된 POS/SOS의 물성 연구 및 artificial cocoa butter 제조	100%	- 증류한 반응물의 symmetrical triacylglycerol 조성 분석 (Ag-HPLC 분석) - 분획한 반응물의 symmetrical triacylglycerol 조성 분석(Ag-HPLC 분석) -DSC 분석
		○ 대량 합성한 반응물의 정제를 통한 artificial cocoa butter의 물리적·화학적 특성 구명	100%	- 증류후 분별된 반응물들의 DSC 분석(melting and crystallization profile) -분별(acetone fractionation)조건 확립 -대량 합성물의 정제 및 물리화학적 특성 구명
	○ 재결정법에 의한 POS/SOS 정제 Pilot 생산 (시험생산_ : 20kg 시생산 (제1협동)	○ 20kg 재결정 시생산(artificial cocoa butter 제조)	100%	- 연속식에서 대량 생산한 반응물의 증류정제 및 solvent fractionation 수행
		○ 시 생산 제품의 품질 분석	100%	- 초콜릿 시제품 생산

## 제 3 절 관련 분야의 기여도

### 1. 기술적 측면

- 가. 친환경 효소공법을 이용한 artificial cocoa butter의 개발로 국내 식품산업육성을 위한 기초자료 확보
- 나. POS(1-palmitoyl-2-oleoyl-3-stearoyl-*sn*-glycerol)/SOS(1,3-distearoyl-2-oleoyl-*sn*-glycerol) 합성기술 획득
- 다. 국내 저 트랜스 artificial cocoa butter 합성을 위한 효소공법 기술력 확보.
- 라. 원료의 추출, 정제 방법 확립 및 분석 기술 확보 및 산업체 활용.
- 마. Artificial cocoa butter의 구성원료인 POS/SOS의 분획(fractionation)조건 확립 및 기술력 구축으로 인한 특허활용 가능.
- 바. Artificial cocoa butter 합성은 초콜릿 제품 이외의 다양한 식품 소재원으로도 활용 가능함.

## 2. 경제 및 산업적 측면

- 가. 본 기술의 개발로 코코아버터 자급기술 확보 및 국내식품업체의 경쟁력 강화.
- 나. 국내 카놀라유를 이용한 artificial cocoa butter의 개발로 인한 국내 유자원의 적극 활용 및 고부가가치 식품소재 개발.
- 다. 환경 친화적인 효소공법의 이용으로 인한 식품 안전성 확보.
- 라. 국내 초콜릿 사업의 경쟁력 강화 및 국외의 초콜릿 시장 진출 가능.
- 마. 국내 식품업체의 기술력 확보로 인한 경쟁력 강화 및 수출력 증대로 국가 경쟁력을 강화함.
- 바. Artificial cocoa butter 제조는 국내 식품업체에서도 큰 관심을 갖는 식품소재로써, 산업화를 유도(기술이전)함과 동시에 국민의 기호에 크게 기여할 수 있음.

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 제 1 절. 본 연구로부터 발생한 성과

#### 1. 국제 SCI급 학술지 논문 발표

- 1) Scaled-up production of zero-trans margarine fat using pine nut oil and palm stearin, Food Chemistry, 2010, 119, p1332-1338.

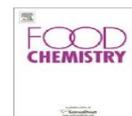
Food Chemistry 119 (2010) 1332–1338



Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foodchem](http://www.elsevier.com/locate/foodchem)



#### Scaled-up production of zero-trans margarine fat using pine nut oil and palm stearin

Prakash Adhikari<sup>a</sup>, Xue-Mei Zhu<sup>a</sup>, Anupama Gautam<sup>a</sup>, Jung-Ah Shin<sup>a</sup>, Jiang-Ning Hu<sup>a</sup>, Jeung-Hee Lee<sup>a</sup>, Casimir C. Akoh<sup>b</sup>, Ki-Teak Lee<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Department of Food Science and Technology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, South Korea

<sup>b</sup>Department of Food Science and Technology, The University of Georgia, Food Science Building, Athens, GA 30602, USA

#### ARTICLE INFO

##### Article history:

Received 6 March 2009

Received in revised form 24 June 2009

Accepted 3 September 2009

##### Keywords:

Pine nut oil

Palm stearin

Interesterification

DSC

Phytosterol

#### ABSTRACT

An interesterified structured lipid was produced with a lipid mixture (600 g) of pine nut oil (PN) and palm stearin (PS) at two weight ratios (PN:PS 40:60 and 30:70) using lipase (Lipozyme TL IM, 30 wt.%) as a catalyst at 65 °C for 24 h. Major fatty acids in the interesterified products were palmitic (35.1–40.4%), oleic (29.5%), and pinolenic acid (*cis*-5, *cis*-9, *cis*-12 18:3; 4.2–5.9%).  $\alpha$ -Tocopherol (1.1–1.3 mg/100 g) and  $\gamma$ -tocopherol (0.3–0.4 mg/100 g) were detected in the interesterified products. Total phytosterols (campesterol, stigmasterol, and  $\beta$ -sitosterol) in the interesterified products (PN:PS 40:60 and 30:70) were 63.2 and 49.6 mg/100 g, respectively. Solid fat contents at 25 °C were 23.6% (PN:PS 40:60) and 36.2% (PN:PS 30:70). Mostly  $\beta$  crystal form was found in the interesterified products. Zero-trans margarine fat stock with desirable properties could be successfully produced from pine nut oil and palm stearin.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

- 2) Lipase-catalyzed interesterification of high oleic sunflower oil and fully hydrogenated soybean oil comparison of batch and continuous reactor for production of zero trans shortening fats, LWT-Food Science and Technology, 2010, 43, p458-464.

LWT - Food Science and Technology 43 (2010) 458–464



Contents lists available at ScienceDirect

LWT - Food Science and Technology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/lwt](http://www.elsevier.com/locate/lwt)



#### Lipase-catalyzed interesterification of high oleic sunflower oil and fully hydrogenated soybean oil comparison of batch and continuous reactor for production of zero trans shortening fats

D. Li<sup>a</sup>, P. Adhikari<sup>a</sup>, J.-A. Shin<sup>a</sup>, J.-H. Lee<sup>a</sup>, Y.-J. Kim<sup>a</sup>, X.-M. Zhu<sup>a</sup>, J.-N. Hu<sup>a</sup>, J. Jin<sup>a</sup>, C.C. Akoh<sup>b</sup>, K.-T. Lee<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Department of Food Science and Technology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, South Korea

<sup>b</sup>Department of Food Science and Technology, The University of Georgia, Food Science Building, Athens, GA 30602, USA

#### ARTICLE INFO

##### Article history:

Received 21 March 2009

Received in revised form

31 August 2009

Accepted 3 September 2009

##### Keywords:

Lipase-catalyzed interesterification

Fully hydrogenated soybean oil

Solid fat content

Melting point

Triacylglycerol

#### ABSTRACT

Lipase-catalyzed interesterification of high oleic sunflower oil (HO) and fully hydrogenated soybean oil (FHSBO) at different weight ratios (55:45, 60:40, 65:35 and 70:30, HO:FHSBO) was carried out in both a batch-type reactor (BA) and a packed-bed reactor (PBR) to produce zero trans shortening. Interesterified products in both PBR and BA consisted of 34–46 g/100 g saturated fatty acids (SFA) (mainly stearic acid) and 54–66 g/100 g unsaturated fatty acid (USFA) (mainly oleic acid). After interesterification the physical characteristics such as melting point and solid fat content (SFC) were changed in each product. The differential scanning calorimetry (DSC) result showed that SFC content in PBR was higher than that in BA at each measured temperature. Decrease in tocopherols was also observed, however, the PBR product contained much higher amounts of tocopherols than BA product.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

- 3) Enzymatic interesterification of anhydrous butterfat with flaxseed oil and palm stearin to produce low-trans spreadable fat, *Food Chemistry*, 2010, 120, p1-9.



## Enzymatic interesterification of anhydrous butterfat with flaxseed oil and palm stearin to produce low-trans spreadable fat

Jung-Ah Shin<sup>a</sup>, Casimir C. Akoh<sup>b</sup>, Ki-Teak Lee<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Department of Food Science and Technology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Republic of Korea

<sup>b</sup>Department of Food Science and Technology, The University of Georgia, Food Science Building, Athens, GA 30602-7610, United States

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 21 March 2009

Received in revised form 10 September 2009

Accepted 16 September 2009

#### Keywords:

Anhydrous butterfat

Differential scanning calorimeter

Equivalent carbon number

Flaxseed oil

Enzymatic interesterification

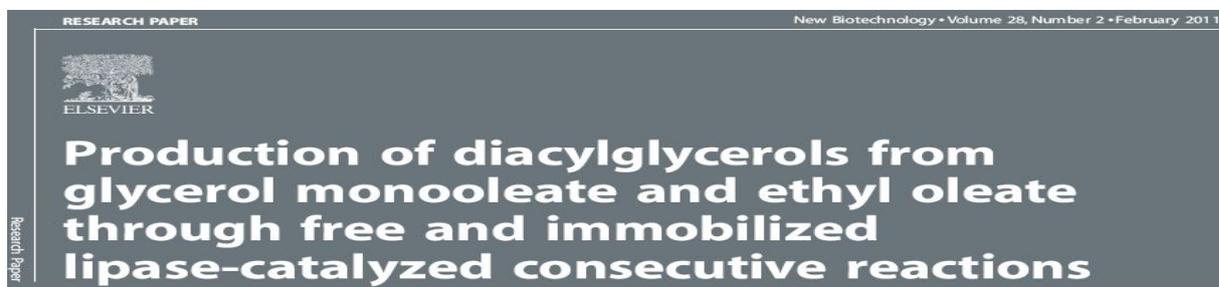
Melting point

### ABSTRACT

Lipase-catalysed interesterification was performed to produce low-trans spreadable fat (LTSF) with anhydrous butterfat (ABF), flaxseed oil (FSO), and palm stearin (PS) using biocatalysts (Lipozyme RM IM and Novozym SP435). The reaction was carried out for 24 h at 60 °C in a shaking water bath (180 rpm). Seven substrate blends for the production of LTSF were prepared: 12:6:2, 10:6:4, 9:6:6, 8:6:6, 6:6:8, 6:6:9, and 4:6:10 (ABF/PS/FSO, by weight). After 24-h interesterification, decreased saturated fatty acid (SFA) contents in LTSFs were observed with ranges from 67% to 41%. LTSFs exhibited low atherogenic index (AI) with ranges from 2.8 to 0.8, compared with 3.3–4.7 AI of butter fat. Equivalent carbon number (ECN) 42–46 in the newly produced triacylglycerol (TAG) increased according to rearrangement of FAs on TAG backbone. The  $\alpha$ -linolenic acid contents (mol%) of each LTSF were 5.6% (12:6:2), 10.7% (10:6:4), 15.1% (9:6:6), 15.8% (8:6:6), 20.8% (6:6:8), 22.4% (6:6:9) and 26% (4:6:10). The trans fatty acids in the LTSFs was not more than 2%. Melting point ranges of LTSF were from 37 (9:6:6) to 32 °C (4:6:10).

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

- 4) Production of diacylglycerols from glycerol monooleate and ethyl oleate through free and immobilized lipase-catalyzed consecutive reactions, *New Biotechnology*, 2011, 28, p190-195.



Juan Jin<sup>1</sup>, Dan Li<sup>1</sup>, Xue Mei Zhu<sup>1</sup>, Prakash Adhikari<sup>1</sup>, Ki-Teak Lee<sup>1</sup> and Jeung-Hee Lee<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Food Science and Technology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, South Korea

<sup>2</sup> Department of Food and Nutrition, Chungnam National University, Daejeon 305-764, South Korea

The ability of free and immobilized lipase on the production of diacylglycerols (DAG) by transesterification of glycerol monooleate (GMO) and ethyl oleate was investigated. Among three free lipases such as lipase G (*Penicillium cyclopium*), lipase AK (*Pseudomonas fluorescens*) and lipase PS (*Pseudomonas cepacia*), lipase PS exhibited the highest DAG productivity, and the DAG content gradually increased up to 24 hours reaction and then remained steady. The comparative result for DAG productivity between free lipase PS and immobilized lipases (lipase PS-D and Lipozyme RM IM) during nine times of 24 hours reaction indicated that total DAG production was higher in immobilized lipase PS-D (183.5 mM) and Lipozyme RM IM (309.5 mM) than free lipase PS (122.0 mM) at the first reaction, and that the DAG production rate was reduced by consecutive reactions, in which more *sn*-1,3-DAG was synthesized than *sn*-1,2-DAG. During the consecutive reactions, the activity of lipase PS was relatively steady by showing similar DAG content, whereas DAG production of lipase PS-D and Lipozyme RM IM was gradually decreased to 69.9 and 167.1 mM at 9th reaction, respectively, resulting in 62% and 46% reduced production when compared with 1st reaction. Interestingly, from 7th reaction lipase PS produced more DAG than immobilized lipase PS-D, and exhibited a stable activity for DAG production. Therefore, the present study suggested that DAG productivity between GMO and ethyl oleate was higher in immobilized lipases than free lipases, but the activity was reduced with repeated uses.

- 5) Production of trans-free margarine stock by enzymatic interesterification of rice bran oil, palm stearin and coconut oil, *J Sci Food Agric.*, 2010, 90, p703-711.

# Production of *trans*-free margarine stock by enzymatic interesterification of rice bran oil, palm stearin and coconut oil

Prakash Adhikari,<sup>a</sup> Jung-Ah Shin,<sup>a</sup> Jeung-Hee Lee,<sup>a</sup> Jiang-Ning Hu,<sup>a</sup> Xue-Mei Zhu,<sup>a</sup> Casimir C Akoh<sup>b</sup> and Ki-Teak Lee<sup>a\*</sup>

## Abstract

**BACKGROUND:** *Trans*-free interesterified fat was produced for possible usage as a spreadable margarine stock. Rice bran oil, palm stearin and coconut oil were used as substrates for lipase-catalyzed reaction.

**RESULTS:** After interesterification, 137–150 g kg<sup>-1</sup> medium-chain fatty acid was incorporated into the triacylglycerol (TAG) of the interesterified fats. Solid fat contents at 25 °C were 15.5–34.2%, and slip melting point ranged from 27.5 to 34.3 °C. POP and PPP ( $\beta$ -tending TAG) in palm stearin decreased after interesterification. X-ray diffraction analysis demonstrated that the interesterified fats contained mostly  $\beta'$  polymorphic forms, which is a desirable property for margarines.

**CONCLUSIONS:** The interesterified fats showed desirable physical properties and suitable crystal form ( $\beta'$  polymorph) for possible use as a spreadable margarine stock. Therefore, our result suggested that the interesterified fat without *trans* fatty acid could be used as an alternative to partially hydrogenated fat.

© 2010 Society of Chemical Industry

**Keywords:** enzymatic interesterification; solid fat content; polymorphism; oxidative stability; rice bran oil; palm stearin

## 2. 국내 학술등재지 논문 발표

- 1) 종실유(seeds oil)의 위치별 지방산 및 트리아실글리세롤의 조성 연구, 한국식품저장유통학회, 2009, 16, p726-733.

Korean J. Food Preserv.  
Vol. 16, No. 5, pp. 726-733, October 2009

식품 한국식품저장유통학회  
THE KOREAN SOCIETY OF FOOD PRESERVATION

## 종실유(seeds oil)의 위치별 지방산 및 트리아실글리세롤의 조성 연구

문준희 · 황윤익 · 이기택<sup>†</sup>  
충남대학교 식품공학과

### Study on the Positional Distribution of Fatty Acids, and Triacylglycerol Separation, of Seed Oils

Jun-Hee Moon, Yun-Ik Hwang and Ki-Teak Lee<sup>†</sup>

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

#### Abstract

Six types of oil were extracted from pomegranate seed, mung bean, pepper seed, safflower seed, seeds of Cassia tora Linnaeus, and perilla seed. The extracted seed oils were analyzed for total and positional fatty acid composition, triacylglycerol (TAG) level, and tocopherol content. Crude fat levels measured by the Folch method were 21.64% in perilla seed, 13.85% in safflower seed, 9.60% in pepper seed, 8.85% in pomegranate seed, 2.25% in mung bean, and 2.00% in *C. tora*, respectively (all w/w). Linoleic acid (C18:2) was the most abundant fatty acid at the sn-2 position of triacylglycerols (TAGs), ranging from 15.99–88.3 wt%. The composition of TAGs was analyzed by reverse-phase HPLC, and TAGs of seed oils showed partition numbers of 36–48. The highest content (377.74 mg/100 g) of total tocopherol was found in pomegranate seed whereas the total tocopherol content of mung bean, *C. tora*, pepper seed, perilla seed, and safflower seed were 141.16, 107.23, 33.88, 30.05, and 29.80 mg/100 g, respectively.

**Key words :** seed oil, fatty acid composition, positional fatty acid composition, partition number, tocopherol

- 2) 시중 닭튀김의 구성 지방산 조성, 한국식품조리과학회, 2009, 25, p600-605.

KOREAN J. FOOD COOKERY SCI.  
Vol. 25, No. 5, pp. 600-605 (2009)

## 시중 닭튀김의 구성 지방산 조성

김영주 · 이기택<sup>\*</sup>  
충남대학교 식품공학과

## Evaluation of the Fatty Acid Composition of Fried-chicken Sold in the Market

Young-Joo Kim and Ki-Teak Lee<sup>\*</sup>

Department of Food Science and Technology, Chungnam National University

### Abstract

This study was conducted to investigate the fat content, fatty acid composition, *trans* fatty acid content, and acid value of twenty types of fried chickens purchased in local markets in Korea. The fat was extracted from the fried chickens and analyzed by the folch method, which revealed that the content ranged from 4.94% to 18.06%. The major fatty acids in the fried chickens were oleic acid (29.78~67.85%), linoleic acid (8.42~39.54%), and palmitic acid (10.67~25.43%). Twenty types of fried chickens contained less than 0.1 g of *trans* fatty acid per 100 g of chicken, while the fatty acid value ranged from 0.86~2.65, which is lower than the KFDA criteria.

**Key words:** fat content, fatty acid composition, *trans* fatty acid, acid value

- 3) Coconut oil 분별유와 palm 분별유로부터 효소적 interesterification에 의한 코코아버터 대체유지 합성, 한국식품영양과학회지, 2010, 39, p1487-1494.

J Korean Soc Food Sci Nutr  
39(10), 1487-1494(2010)

한국식품영양과학회지  
DOI: 10.3746/jkfn.2010.39.10.1487

## Coconut Oil 분별유와 Palm 분별유로부터 효소적 Interesterification에 의한 코코아 버터 대체유지 합성

배상균 · 이경수 · 이기택<sup>\*</sup>  
충남대학교 식품공학과

## Synthesis of Cocoa Butter Alternative from Coconut Oil Fraction and Palm Oil Fractions by Lipase-Catalyzed Interesterification

Sang-Kyun Bae, Kyung-Su Lee, and Ki-Teak Lee<sup>\*</sup>

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

### Abstract

Structured lipid (SL) for cocoa butter alternative was synthesized by interesterification of coconut oil fraction and palm stearin (6:4 and 8:2, by weight) in a shaking water bath at 60°C and 180 rpm. It was performed for various reaction times (1, 2, 3, and 6 hr). The reaction was catalyzed by *sn*-1,3 specific Lipozyme TLIM (immobilized lipase from *Thermomyces lanuginosus*). SL-solid part was obtained from acetone fractionation at 0°C. SL-solid part was blended with other palm oils and fractions for desirable property of cocoa butter alternative (SL-solid part : palm middle fraction : palm stearin solid : palm oil, 70.4:18.4:2.9:8.3, by weight). In reversed-phase HPLC analysis, triacylglycerol species of cocoa butter alternative had partition number of 40 (10.77%), 42 (13.06%), 44~46 (17.38%) and 48 (51.88%). Major fatty acids of cocoa butter alternative were lauric acid (16.5%), myristic acid (12.28%), palmitic acid (46.03%), and linoleic acid (14.75%). Solid fat content (SFC) and polymorphic form ( $\beta'$  form) of cocoa butter alternative prepared were similar to those of commercial cocoa butter replacer (CBR).

**Key words:** cocoa butter alternative, coconut oil, palm stearin, interesterification

- 4) 카놀라유와 대두극도경화유로부터 효소적으로 합성된 저트랜스 스프레드 고체지의 특성, 한국식품영양과학회지, 39, p1328-1334.

*J Korean Soc Food Sci Nutr*  
39(9), 1328-1334(2010)

한국식품영양과학회지  
DOI: 10.3746/jkfn.2010.39.9.1328

### 카놀라유와 대두극도경화유로부터 효소적으로 합성된 저트랜스 스프레드 고체지의 특성

김영주 · 류현경 · 신정아 · 이기택\*  
충남대학교 식품공학과

### Development and Physical Properties of Low-*Trans* Spread Fat from Canola and Fully Hydrogenated Soybean Oil by Lipase-Catalyzed Synthesis

Young-Joo Kim, Hyun-Kyeong Lyu, Jung-Ah Shin, and Ki-Teak Lee\*

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

#### Abstract

Low-*trans* spread fat (LTSF) was produced by lipase-catalyzed synthesis of canola (CO) and fully hydrogenated soybean oil (FHSBO) at 65:35 (w/w). Blend of CO and FHSBO with 65:35 ratio was interesterified using Lipozyme TLIM (immobilized *Thermomyces lanuginosus*, 20% of total substrate) in a 1 L-batch type reactor at 70°C with 500 rpm for 24 hr. Then, physicochemical melting properties of LTSF were compared with commercial spread fat. At 20°C, solid fat contents (SFC) of commercial spread fat as a control and LTSF were similar, showing 19.1 and 18.1%, respectively. Major compositional fatty acids of LTSF were C18:0, C18:1 and C18:2 (29.2, 41.8 and 13.3 wt%, respectively). *Trans* fatty acid content of the LTSF (0.2 wt%) was lower than that of commercial spread fat (5.5 wt%). In the RP-HPLC analysis from LTSF, major triacylglycerol (TAG) molecules were SOL (stearoyl-oleoyl-linoleyl), SOO, POS/PSP, and SOS. Also, polymorphic form and x-ray diffraction of LTSF showed coexistence of  $\beta'$  and  $\beta$  form crystals.

**Key words:** enzymatic interesterification, canola oil, low-*trans* spread fat, polymorphic form, x-ray diffraction

- 5) Comparison of seed oil characteristics from Korean ginseng, Chinese ginseng and American ginseng, *J Food Science and Nutrition*, 2010, 15, p275-281.

*J Food Sci Nutr*  
Vol 15, p 275-281 (2010)  
DOI: 10.3746/jfn.2010.15.4.275

J Food Science  
and Nutrition

### Comparison of Seed Oil Characteristics from Korean Ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) and American Ginseng (*Panax quinquefolium* L.)

Xue-Mei Zhu<sup>1</sup>, Jiang-Ning Hu<sup>2</sup>, Jung-Ah Shin<sup>1</sup>, Jeung-Hee Lee<sup>3</sup>, Soon-Teak Hong<sup>1</sup>, and Ki-Teak Lee<sup>1†</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Science and Technology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

<sup>2</sup>State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China

<sup>3</sup>Institute of Agricultural Science, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

#### Abstract

The chemical characteristics of seed oils of Asian ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) at different ages grown in Korea (3, 4 and 5-year old) and China (5-year old), and American ginseng (*Panax quinquefolium* L., 5-year old) grown in China were compared. Total fatty acid composition showed a significantly higher oleic acid content in American (87.50%) than in Korean (68.02-69.14%) and Chinese ginseng seed oils (61.19%). At the *sn*-2 position, the highest oleic acid (81.09%) and lowest linoleic acid (15.77%) were found in American ginseng seed oil. The main triacylglycerol species in ginseng seed oils were triolein (OOO) and 1,2-dioleoyl-3-linoleoyl-glycerol (LOO)/1,3-dioleoyl-2-linoleoyl-glycerol (OLO). In addition, the seed oils possessed an ideal oxidative stability showing 16.55-23.12 hr of induction time by Rancimat test. The results revealed that ginseng seed oil could be developed as a new healthy edible oil, and that the oil's chemical characteristics were strongly associated with the ginseng species and habitats.

**Key words:** ginseng seed oil, fatty acid composition, triacylglycerol, chemical characteristics, oxidative stability

- 6) Canola oil로부터 코코아버터와 유사한 Triacylglycerol 조성을 가진 재구성지질의 효소적 합성 최적화 연구, 한국식품영양과학회지, 2011, 40, p1430-1437.

*J Korean Soc Food Sci Nutr*  
40(10), 1430-1437(2011)

한국식품영양과학회지  
<http://dx.doi.org/10.3746/jkfn.2011.40.10.1430>

### Canola Oil로부터 코코아버터와 유사한 Triacylglycerol 조성을 가진 재구성지질의 효소적 합성 최적화 연구

문준희 · 이정희 · 신정아 · 홍순택 · 이기택\*

충남대학교 식품공학과

### Optimization of Lipase-Catalyzed Production of Structured Lipids from Canola Oil Containing Similar Composition of Triacylglycerols to Cocoa Butter

Jun-Hee Moon, Jeung-Hee Lee, Jung-Ah Shin, Soon-Taek Hong, and Ki-Teak Lee\*

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

#### Abstract

Synthesis conditions of cocoa butter equivalents were optimized using the response surface method (RSM) by interesterification of canola oil (Ca), palmitic ethyl ester (PEE), and stearic ethyl ester (StEE). The reaction was catalyzed by immobilized lipase (Lipozyme TLIM) from *Thermomyces lanuginosa* to produce structured lipids containing a composition of triacylglycerols similar to cocoa butter. Reaction conditions were optimized using D-optimal design with the three reaction factors of the substrate molar ratio of canola oil to palmitic ethyl ester and stearic ethyl ester (Ca : PEE : StEE = 1:1:3, 1:1.66:5, 1:2:6, 1:2.33:7, 1:3:9, X<sub>1</sub>), enzyme ratio (2~6%, X<sub>2</sub>), and reaction time (30~270 min, X<sub>3</sub>). The optimal conditions that minimized acyl-migration while maximizing 1-palmitoyl-2-oleoyl-3-stearoyl glycerol (POS), 1,3-distearoyl-2-oleoyl glycerol (SOS), and 1,3-dipalmitoyl-2-oleoyl glycerol (POP) were predicted, resulting in Ca : PEE : StEE = 1:3:9, 6% of enzyme ratio, and 40 min of reaction time. The reaction product of structured lipids was synthesized again under the same conditions, showing 10.43 area% of acyl-migration, 25.31 area% of POS/PSO, 19.79 area% of SOS, and 11.22 area% of POP.

**Key words:** cocoa butter equivalent, canola oil, cocoa butter, acyl-migration

- 7) 천연 식물 고체지와 팜스테아린 분별유 혼합물의 solid fat index 및 triacylglycerol 조성 비교, 한국식품영양과학회지, 2011, 40, p1438-1446.

*J Korean Soc Food Sci Nutr*  
40(10), 1438-1446(2011)

한국식품영양과학회지  
<http://dx.doi.org/10.3746/jkfn.2011.40.10.1438>

### 천연 식물고체지와 팜스테아린 분별유 혼합물의 Solid Fat Index 및 Triacylglycerol 조성 비교

성민혜 · 홍순택 · 이기택\*

충남대학교 식품공학과

### Comparison of Solid Fat Index and Triacylglycerol Composition of the Blends from Natural Vegetable Fats and Palm Stearin Fraction

Min-Hye Sung, Soon-Taek Hong, and Ki-Teak Lee\*

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

#### Abstract

Palmitoyl-oleoyl-oleoyl (POO) and palmitoyl-oleoyl-palmitoyl triacylglycerol rich fraction (PSL) was obtained from the acetone fractionation of palm stearin. The fatty acid composition (total and positional), triacylglycerol species, and solid fat index (SFI) were compared among the blends of natural vegetable fats (sal fat, illipe fat, kokum fat, shea stearin fat, and shea butter) and PSL with different ratios (50:50, 60:40, 65:35, 70:30). In total fatty acid composition of PSL, palmitic, oleic, and linoleic acids were the major fatty acids, whereas in natural vegetable fats stearic and palmitic acids were the major fatty acids. Moreover, oleic acid was a major fatty acid at sn-2 position in sal fat, illipe fat, and kokum fat. The TAG species was analyzed by reversed-phase HPLC, from which the PN value ranged from 46 to 54. When natural vegetable fats and PSL were blended with different ratios, decreasing the amount of PSL resulted in increasing SFI in most cases. Among blends, the SFI of sal fat and PSL were most similar to commercial cocoa butter equivalent (CBE).

**Key words:** cocoa butter equivalent (CBE), palm stearin, natural vegetable fat, solid fat index (SFI)

- 8) 반응표면분석법에 의한 POO과 POP의 아세톤 분별 공정 최적화, 한국식품영양과학회지, 40, p975-980.

*J Korean Soc Food Sci Nutr*  
40(7), 975-980(2011)

한국식품영양과학회지  
DOI: 10.3746/jkfn.2011.40.7.975

반응표면분석법에 의한 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-3-Oleoyl Glycerol과  
1-Palmitoyl-2-Oleoyl-3-Palmitoyl Glycerol의 아세톤 분별 공정 최적화

신정아 · 성민혜 · 이선모 · 손정매 · 이정희 · 홍순택 · 이기택\*  
충남대학교 식품공학과

Optimization of Acetone-Fractionation for 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-3-Oleoyl  
Glycerol and 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-3-Palmitoyl Glycerol  
by Response Surface Methodology

Jung-Ah Shin, Min-Hye Sung, Sun Mo Lee, Jeoung-Mae Son,  
Jeung-Hee Lee, Soon-Taek Hong, and Ki-Teak Lee\*

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

Abstract

1-Palmitoyl-2-oleoyl-3-oleoyl glycerol (POO) and 1-palmitoyl-2-oleoyl-3-palmitoyl glycerol (POP) were enriched from palm stearin using an acetone fractionation process. Response surface methodology was employed to optimize the purity of POO ( $Y_1$ , %) and POP ( $Y_2$ , %) along with POO+POP content ( $Y_3$ , g) based on independent variables such as fractionation temperature ( $X_1$ , 25, 30, and 35°C) and the ratio of palm stearin to acetone ( $X_2$ , 1:3, 1:6 and 1:9, w/v). Fractionation conditions were optimized to maximize  $Y_1$ ,  $Y_2$ , and  $Y_3$ , in which fractionation temperature was 29.3°C with a 1:5.7 acetone ratio. With such parameters, 60.9% of POP and 23.8% of POO purity were expected with a 75% yield (3.0 g) of POO and POP.

**Key words:** 1-palmitoyl-2-oleoyl-3-oleoyl glycerol, 1-palmitoyl-2-oleoyl-3-palmitoyl glycerol, response surface methodology, acetone fractionation

- 9) 팜중부유를 이용한 대칭형 POS Triacylglycerol의 효소적 합성 반응연구, 한국식품영양과학회지, 2011, 40, p1113-1120.

*J Korean Soc Food Sci Nutr*  
40(8), 1113-1120(2011)

한국식품영양과학회지  
<http://dx.doi.org/10.3746/jkfn.2011.40.8.1113>

팜중부유를 이용한 대칭형 Palmitoyl-Oleoyl-Stearoyl Triacylglycerol의  
효소적 합성 반응 연구

이선모 · 신정아 · 홍순택 · 이기택\*  
충남대학교 식품공학과

A Study of the Enzymatic Interesterification Reaction for Producing  
Palmitoyl-Oleoyl-Stearoyl Triacylglycerol from the Palm Mid Fraction

Seon-Mo Lee, Jung-Ah Shin, Soon-Taek Hong, and Ki-Teak Lee\*

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

Abstract

Enzymatic interesterification was conducted with the palm mid fraction (PMF) and stearic ethyl ester for 1, 5, and 9 hr at 46°C. The reaction was catalyzed by Lipozyme TLIM (2, 3, and 4% by weight of total substrates) in a shaking water bath at 180 rpm. As the reaction continued, oleic acid (C18:1) content at the sn-2 position decreased, whereas saturated fatty acid (C16:0 and C18:0) content increased. In the high performance chromatography analysis, 1,3-dipalmitoyl-2-oleoyl glycerol content decreased, whereas 1(3)-palmitoyl-2-oleoyl-3(1)-stearoyl glycerol (POS) content increased up to the reaction equilibrium. The rate of acyl migration increased with increasing molar ratio and enzyme load as well as reaction time. The optimal reaction conditions for maximizing POS content (53.5 area%) and minimizing acyl migration (23.1 area%) were obtained with a PMF : stearic ethyl ester=1:2 (molar ratio), Lipozyme TLIM 3 wt%, and a reaction time of 5 hr.

**Key words:** enzymatic interesterification, palm mid fraction, acyl migration, 1(3)-palmitoyl-2-oleoyl-3(1)-stearoyl glycerol

- 10) Camellia oil로부터 POS을 함유한 효소적 합성반응물의 최적화 연구, 한국식품저장유통학회, 2011, 18, P721-728.

*J Korean Soc Food Sci Nutr*  
40(8), 1113~1120(2011)

한국식품영양과학회지  
<http://dx.doi.org/10.3746/jkfn.2011.40.8.1113>

팜중부유를 이용한 대칭형 Palmitoyl-Oleoyl-Stearoyl Triacylglycerol의  
효소적 합성 반응 연구

이선모 · 신정아 · 홍순택 · 이기택\*  
충남대학교 식품공학과

A Study of the Enzymatic Interesterification Reaction for Producing  
Palmitoyl-Oleoyl-Stearoyl Triacylglycerol from the Palm Mid Fraction

Seon-Mo Lee, Jung-Ah Shin, Soon-Tack Hong, and Ki-Teak Lee\*

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

Abstract

Enzymatic interesterification was conducted with the palm mid fraction (PMF) and stearic ethyl ester for 1, 5, and 9 hr at 46°C. The reaction was catalyzed by Lipozyme TLIM (2, 3, and 4% by weight of total substrates) in a shaking water bath at 180 rpm. As the reaction continued, oleic acid (C18:1) content at the sn-2 position decreased, whereas saturated fatty acid (C16:0 and C18:0) content increased. In the high performance chromatography analysis, 1,3-dipalmitoyl-2-oleoyl glycerol content decreased, whereas 1(3)-palmitoyl-2-oleoyl-3(1)-stearoyl glycerol (POS) content increased up to the reaction equilibrium. The rate of acyl migration increased with increasing molar ratio and enzyme load as well as reaction time. The optimal reaction conditions for maximizing POS content (53.5 area%) and minimizing acyl migration (23.1 area%) were obtained with a PMF : stearic ethyl ester=1:2 (molar ratio), Lipozyme TLIM 3 wt%, and a reaction time of 5 hr.

**Key words:** enzymatic interesterification, palm mid fraction, acyl migration, 1(3)-palmitoyl-2-oleoyl-3(1)-stearoyl glycerol

- 11) 반응표면분석에 의한 모유대체지의 효소적 합성조건 최적화, 한국식품과학회지, 2011, 43, p689-695.

한국식품과학회지 2011 ; 43(6): 689-695

Optimization of Lipase-Catalyzed Interesterification for Production of Human Milk Fat Substitutes  
by Response Surface Methodology

반응표면분석에 의한 모유대체지의 효소적 합성조건 최적화

Jeoung-Mae Son, Jeung-Hee Lee, Cheng-Lian Xue, Soon-Taek Hong, and Ki-Teak Lee\*

Department of Food Science and Technology, Chungnam National University

손정매·이정희·설성련·홍순택·이기택\*

충남대학교 식품공학과

ABSTRACT

1,3-Dioleoyl-2-palmitoylglycerol (OPO)-rich human milk fat substitute (HMFS) was synthesized from tripalmitin (PPP)-rich fraction and oleic ethyl ester by a lipase-catalyzed interesterification. Response surface methodology (RSM) was employed to optimize the presence of palmitic acid at sn-2 position (Y1, %) and of oleic acid at sn-1,3 (Y2, %), with the reaction factors as substrate molar ratio of PPP-rich fraction to oleic ethyl ester (X1, 1:4, 1:5 and 1:6), reaction temperature (X2, 50, 55 and 60°C), and time (X3, 3, 7.5 and 12 h). The optimal conditions for HMFS synthesis were predicted at the reaction combination of 55°C, 3 h and 1:6 substrate ratio. HMFS re-synthesized under the same conditions displayed 70.70% palmitic acid at the sn-2 position and 69.58% oleic acid at the sn-1,3 position. Reaction product was predominantly (90.35%) triacylglycerol (TAG) was observed in which the major TAG species, OPO, comprised 31.24%.

KEYWORD

human milk fat substrate (HMFS), tripalmitin, oleic ethyl ester, response surface methodology

한국식품과학회지 2011 Dec; 43(6): 689 - 695

### 3. 국내외 학술대회 발표성과

- 1) Coconut oil과 palm stearin의 효소적 반응을 이용한 cocoa butter replacer유지의 생산, 2009년도 한국식품저장유통학회 학술발표회, 2009.11.13, 포스터 발표
- 2) 카놀라유를 이용한 cocoa butter유사지의 효소적 합성연구, 2009년도 한국식품저장유통학회 학술발표회, 2009.11.13, 포스터 발표
- 3) 천연 견과류의 이화학적 특성 및 조성 비교, 2009년도 한국식품저장유통학회 학술발표회, 2009.11.13, 포스터 발표
- 4) Increase of sn-2 positional pinolenic acid in triacylglycerol molecules through Lipozyme TLIM catalyzed interesterification, 2009년도 한국식품저장유통학회 학술발표회, 2009.11.13, 포스터 발표
- 5) Camellia oil을 이용한 POS의 효소적 합성 최적화 연구, 2009년도 한국식품저장유통학회 학술발표회, 2009.11.13, 포스터 발표
- 6) Production of zero *trans* margarine fat using pine nut oil and palm stearin, 2009년도 한국식품저장유통학회 학술발표회, 2009.11.13, 포스터 발표
- 7) POO,POP-rich oil과 고체지들의 blending을 통한 solid fat content 비교, 2010년 동아시아 식생활학회 제38차 춘계학술대회, 2010.5.28, 포스터 발표
- 8) 효소적 interesterification에 의한 coconut oil 분별유로부터 코코아 버터 대체지 합성 연구, 2010년 동아시아 식생활학회 제38차 춘계학술대회, 2010.5.28, 포스터 발표
- 9) Palm mid fraction과 stearic ethyl ester를 이용한 POS 합성연구, 2010년 동아시아 식생활학회 제38차 춘계학술대회, 2010.5.28, 포스터 발표
- 10) Crystallization and oxidative stability of the interesterified hard fat from rice bran oil, fully hydrogenated soybean oil and coconut oil through lipase-catalyzed reaction, 2010년 동아시아 식생활학회 제38차 춘계학술대회, 2010.5.28, 포스터 발표
- 11) 반응표면분석을 이용한 camellia oil의 1(3)-palmitoyl-3(1)-stearoyl-2-monoolein(POS) 효소적 합성 최적화 연구, 2010년 동아시아 식생활학회 제38차 춘계학술대회, 2010.5.28, 포스터 발표
- 12) Conversion of canola oil to symmetrical fat in a packed-bed reactor, 6th International Symposium on Biocatalysis and Biotechnology, AOAC, 일본, 2010.11.17-11.19., 포스터 발표
- 13) Study of enzymatic interesterification reaction fro POS/PSO from palm mid fraction, 6th International Symposium on Biocatalysis and Biotechnology, AOAC, 일본, 2010.11.17-11.19., 포스터 발표
- 14) Study of lipase-catalyzed interesterification of camellia oil with PEE and STEE by RSM, 6th International Symposium on Biocatalysis and Biotechnology, AOAC, 일본, 2010.11.17-11.19., 포스터 발표
- 15) Effects of different ratios of natural vegetable fats and 1,3-dipalmitoyl-2-oleoyl glycerol rich fraction on solid fat index, 6th International Symposium on Biocatalysis and Biotechnology, AOAC, 일본, 2010.11.17-11.19., 포스터 발표

- 16) Stability comparison of anhydrous butter fat and modified-butter fat-in-water emulsions stabilized with skim milk powder, 7th International Symposium on Biocatalysis and Biotechnology, AOAC, 일본, 2011.10.10-10.13., 포스터 발표
- 17) The optimization of acetone-fractionation for triacylglycerols (POP and POO) by response surface methodology, 2011 정기학회 한국식품과학회, 2011.06.09., 포스터 발표
- 18) Enzymatic interesterification of canola oil to produce symmetrical triacylglycerols in a packed-bed reactor, 2011 정기학회 한국식품과학회, 2011.06.09., 포스터 발표
- 19) 카놀라유로부터 비고정화 효소를 이용한 POS 합성에 관한 연구, 2011 정기학회 40차 한국식품영양과학회, 2011.11.01., 포스터 발표
- 20) 국내 유통되는 초콜릿의 트랜스 지방 및 조지방 함량 모니터링, 2011 정기학회 40차 한국식품영양과학회, 2011.11.01., 포스터 발표

## 제 2 절. 본 연구결과의 활용계획

본 과제를 수행함으로써 얻어진 친환경 효소공법을 이용한 artificial cocoa butter의 개발로 국내 식품산업육성을 위한 기초자료로 활용 가능할 것으로 사료된다. 또한, 제조한 artificial cocoa butter 합성은 초콜릿 제품 이외의 다양한 식품 소재원으로도 활용 가능하다. 본 과제가 수행한 연구결과들을 통하여 얻어진 기초 데이터 및 확보된 기술 등을 산학연의 공동 협의 하에 지속적으로 널리 활용한다면 더욱 좋은 성과를 기대해 볼 수 있을 것으로 사료된다. 이 외에도 논문을 더 투고할 예정으로 학문적인 발전에 기여할 수 있을 것으로 사료되며, 학회, 세미나 등을 통하여 연구 수행 결과 등을 홍보함으로써 개발된 artificial cocoa butter의 소재 활용도를 높이는 노력을 지속적으로 할 예정이다.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보

- 유럽(EMEA) 초콜릿 표기 기준에 의하면, 식품유형 중 'Chocolate'은 코코아고형분의 총 함량이 최소 35% 이상이어야 하며 코코아버터가 18% 이상, 무지코코아고형분이 14% 이상이어야 한다고 규정하고 있다. 'Couverture Chocolate'은 코코아고형분의 총 함량이 최소 35% 이상이어야 하며 코코아버터가 31% 이상, 무지코코아고형분이 2.5% 이상이어야 한다. 또한, 'Couverture Milk Chocolate'은 코코아고형분의 총 함량이 최소 25% 이상이어야 하며 무지코코아고형분이 2.5% 이상이어야 한다. 이때 총 지방 함량이 최소 31% 이상이어야 하며 유지지방이 3.5% 이상, 유지고형분이 14% 이상이어야 한다. 표기 기준에서 코코아 고형분의 총 함량은 코코아버터와 무지코코아고형분의 합을 의미하며, 총 지방 함량은 코코아버터와 유지지방의 합을 의미한다.
- 미국(FDA) 초콜릿 표기 기준에 의하면, 식품유형 중 'Milk Chocolate'은 초콜릿리큐어의 함량이 최소 10% 이상, 유지고형분이 12% 이상이어야 한다고 규정하고 있다. 'Dark Chocolate'은 초콜릿리큐어의 함량이 최소 35% 이상이어야 하고, 유지 고형분은 12% 미만이어야 한다. 또한 설탕은 3% 이상이어야 하며, 코코아 팻의 함량이 14% 이상이어야 한다. 'White Chocolate'은 유지고형분이 12% 미만, 설탕 55% 이하, 코코아팻 20% 이상인 초콜릿을 의미한다. 표기 기준에서 초콜릿리큐어란 카카오 열매를 볶아서 만든 걸쭉한 진한 갈색의 반죽을 의미한다. 또한 식품유형 중 'Chocolate'로 표기하기 위해서는 어떠한 다른 유지도 포함되지 않은 순수 카카오 유지만을 이용해야 한다.
- 일본(JFDA) 초콜릿 표기 기준에 의하면, 식품유형 중 'Chocolate'은 코코아고형분의 총 함량이 최소 35% 이상이어야 하며 코코아 버터가 18% 이상이어야 한다고 규정하고 있다. 'Milk Chocolate'은 코코아고형분의 총 함량이 최소 21% 이상이어야 하며 코코아 버터가 18% 이상이어야 한다. 또한 유지지방이 3% 이상, 유지고형분이 14% 이상이어야 한다.
- 한국(KFDA) 초콜릿 표기 기준에 의하면, 식품유형 중 'Chocolate'은 코코아고형분의 총 함량이 최소 35% 이상이어야 하며 코코아버터가 18% 이상, 무지코코아고형분이 15% 이상이어야 한다고 규정하고 있다. 'Milk Chocolate'은 코코아고형분의 총 함량이 최소 25% 이상이어야 하며 무지코코아고형분이 2.5% 이상이어야 한다. 또한 유지지방 함량이 최소 2.5% 이상이어야 하며 유지고형분이 12% 이상이어야 한다. 'White Chocolate'은 코코아버터의 함량이 최소 20% 이상이어야 하며 유지지방이 2.5% 이상, 유지고형분이 14% 이상이어야 한다. 표기 기준에서 코코아고형분의 총 함량은 코코아버터와 무지코코아고형분의 합을 의미한다. 또한 식품유형 중 '초콜릿 가공품'은 건과류, 캔디류, 비스킷류 등 식용 가능한 식품에 위 6가지 초콜릿류를 혼합, 코팅, 충전 등의 방법으로 가공한 것을 의미한다.
- 국내에서는 저급 초콜릿에 주로 쓰이는 cocoa butter replacer 제조는 이루어지고 있으나 고급 초콜릿에 이용되는 cocoa butter와 유사한 유지조성을 지니는 artificial cocoa butter의 제조는 이루어지고 있지 않으며, 대부분은 국외에서 수입해 오고 있는 실정이다.
- 국내업체에서 코코아버터 대용지(cocoa butter replacer)를 생산하고 있다. 이는 저급 초

콜릿에 이용되는 코코아버터 유사지로 기존에는 수소첨가반응을 수행하여 높은 트랜스 지방을 함유하고 있다. 따라서 트랜스 지방을 대체할 수 있는 코코아 버터 유사지의 연구가 필요한 실정이다. 기존의 특허는 초콜릿 제품의 다양화를 위한 한약 초콜릿, 유자 초콜릿 등의 초콜릿 용융액을 이용한 제조분야와 저급 초콜릿에 주로 이용되는 cocoa butter replacer 제조에 치중되어 있다.

- 일본 후지사(Fuji Oil) 는 효소적 interesterification 방법에 의하여 코코아버터 대체지(cocoa butter equivalent, CBE)를 합성하고 있다. 일본의 Osaka와 미국 조지아의 Savannah에 공장도 설립하였다(2007, AOCS exhibition). 원료 제품으로는 Melano New Series(cocoa butter alternatives)와 Melano SS series(anti-blooming and heat) 등이 있으며 이를 이용하여 다양한 고급 초콜릿을 생산하고 있다(Fuji Oil Co., LTD.).
- AarhusKarlshamn(AAK)기업은 세계적인 유지기업의 하나로 양질의 CBE를 생산하고 있다([www.aak.com](http://www.aak.com)). 제품으로는 ILLEXAO™CB(5% replacement of cocoa butter), ILLEXAO™HS(5% or more to improve heat tolerance), ILLEXAO™BR(for improved bloom stability) 등이 있다.
- 중국의 초콜릿 시장은 빠른 속도로 발전하고 있기 때문에 세계에서 가장 발전 잠재력이 크며, 시장 잠재 소비규모는 200억 위안이다. 따라서 국내 식품제조업체에서 고급 초콜릿의 제조에 이용되는 인조 코코아버터(artificial cocoa butter) 를 생산할 경우, 국내 제조업체의 경쟁력을 높여 중국 시장으로의 진출도 용이할 것이다.
- 코코아버터 증량용 대체유지류들 중에서 cocoa butter equivalent의 글로벌 시장 규모는 2000년 약 60톤이었고, 이는 2007년 117톤으로 증가하였으며, 2012년 약 160톤일 것으로 예상됨 (World Report 2008). 또한 브라질, 중국 등 신생 개발국들의 경제수준이 높아짐에 따라 고급 초콜릿의 수요가 증대될 것으로 예상되며, 따라서 이에 사용되는 cocoa butter equivalent의 수요도 증가 될 것임. 그러나 현재 글로벌 공급업체는 일본 및 유럽의 회사들이 대부분을 차지하고 있음.
- 현재 천연 코코아 버터의 시장 가격은 kg당 약 8,000-10,000원인 것으로 보여지나 이는 코코아열매의 작황에 따라 변화가 큼. Cocoa butter equivalent는 제조방법에 따라 약 6,000-8,000원의 가격을 형성하는 것으로 보여짐. 본 공정방법은 pilot제조이기 때문에 제조의 경제성이 고려될 수 없으나, 제조규모가 현 공급업체와 유사하다면 원가형성은 현재 상업용 공급가와 큰 차이가 없을 것으로 보임. 국내외 초콜릿 제조 업체 및 코코아버터 대체지 공급업체를 주 마케팅 대상 업체로 함.

## 제 7 장   참고문헌

1. Shukla VKS. 1995. Cocoa butter properties and quality. *Lipid Technol* 7: 54 - 57.
2. Sato K. 2001. Crystallization behavior of fats and lipids—a review. *Chem Eng Sci* 56: 2255-2265.
3. Chang MK, Abraham G, John VT. 1990. Production of cocoa butter-like fat from interesterification of vegetable oils. *J Am Oil Chem Soc* 67: 832-834.
4. Salas JJ, Bootello MA, Martinez-Force E, Garces R. 2011. Production of stearate-rich butters by solvent fractionation of high stearic - .high oleic sunflower oil. *Food Chem* 124: 450-458.
5. Segalla SD, Artzb WE, Raslana DS, Ferraza VP, Takahashia JA. 2005. Analysis of triacylglycerol isomers in malaysian cocoa butter using HPLC-mass spectrometry. *Food Res Int* 38: 167-174.
6. Ciftcia ON, Padiloglu S, Gogusa F. 2009. Conversion of olive pomace oil to cocoa butter-like fat in a packed-bed enzyme reactor. *Biores Technol* 100: 324-329.
7. Lipp M, Simoneau C, Ulberth F, Anklam E, Crews C, Brereton P, Greyt WD, Schwack W, Wiedmaier C. 2001. Composition of genuine cocoa butter and cocoa butter equivalents. *J Food Compos Anal* 14: 399-408.
8. Lee KT, Akoh CC. 1998. Structured lipids: synthesis and application. *Food Rev Int* 14: 17-34.
9. Lee KT, Foglia TA. 2000. Synthesis, purification and characterization of structured lipids produced from chicken fat. *J Am Oil Chem Soc* 77: 1027-1034.
10. Akoh CC. 1995. Structured lipid: enzymatic approach. *INFORM* 6: 1055-1061.
11. Lee KT, Akoh CC. 1996. Immobilized lipase-catalyzed production of structured lipids with eicosapentaenoic acid at specific positions. *J Am Oil Chem Soc* 73: 611-615.
12. Kim IH, KIM H, Lee KT, Chung SH, Ko SN. 2002. Lipase-catalyzed acidolysis of perilla oil with caprylic acid to produce structured lipids. *J Am Oil Chem Soc* 79: 363-367.
13. Lee KT, Foglia TA. 2001. Fractionation of menhaden oil and partially hydrogenated menhaden oil: characterization of triacylglycerol fractions. *J Am Oil Chem Soc* 78: 297-303.
14. Cho EJ, Lee JH and Lee KT. 2004. Optimization of enzymatic synthesis condition of structured lipids by response surface methodology. *Korean J Food Sci Technol* 36: 531-536.

## 주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.