효소를 이용한 저 칼로리 유지의 생산

Low-calorie structured lipid synthesis by enzymatic transesterification

연구기관

한 국 과 학 기 술 원

농 림 부

주 의

1. **이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.**

2. **이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.**

3. **국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.**

효소를 이용한 저칼로리 유지의 생산

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “효소를 이용한 저 칼로리 유지의 생산” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

1999 . 10. 30 .

주관연구기관명 : 한국과학기술원
총괄연구책임자 : 이 준 식
연 구 원 : 장 영
연 구 원 : 양 택 호

요 약 문

Ⅰ. 제 목

효소를 이용한 저 칼로리 유지의 생산

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 중요성

현재 세계적으로 높은 열량을 제공하는 지방의 대체 물질에 대한 관심이 높아지고 있다. 저 칼로리 지방은 기존의 탄수화물이나 단백질을 이용한 지방 대체 물질과는 달리 지방 고유의 성질을 지니면서 낮은 칼로리를 제공하므로 가장 이상적인 지방 대체물질이라 할 수 있겠다. 또 기존에 생산되는 있는 화학적 저 칼로리 지방은 경우 높은 특허료와 운송비를 지불해 수입해야만 하고 화학적 방법으로 제조했다는 본질적 단점을 가지고 있다. 이를 개선하기 위해서는 독자적인 생산 방법이 필요한데 그 중 가장 유망한 것이 효소적 합성이다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구에서는 효소를 이용한 저 칼로리 생산 시스템 구축을 위해 다양한 반응 시스템을 연구하여 실험해 보았다. 여러 가지 효소 반응 시스템 중 가장 생산 수율이 높은 시스템을 선정하고 효소 반응 조절 인자에 대한 연구를 통해 최적 반응 조건을 탐색하였다. 또 선정한 반응 시스템의 스케일-업 실험을 통해 재현성 여부를 확인하였고 산업화를 위해 가장 고려해야 할 점들과 현재 시점에서 부족한 점들을 연구하였다.

Ⅳ. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

본 연구를 통하여 저 칼로의 유지 효소적 생산에 가장 적합한 시스템은 외부의 수분 첨가와 병행된 진공 반응계이며, 이 시스템을 이용하여 최소 85% 이상의 수율을 얻을 수 있다. 하지만 본 연구의 산업화를 위해서 가장 중요하다고 볼 수 있는 것은 효소의 가격이라 생각되고 이를 극복하기 위해서는 최소량의 효소 사용과 사용 효소의 재사용이 불가피하다고 생각된다.

SUMMARY
(영문요약문)

Salatrim (*s*hort *a*nd *l*ong *a*cyl *t*riglyceride *m*olecule) is a family of structured lipid that provides the physical properties of fat, but with approximately half of the calories of typical edible oil. It can be made into either liquid phase or solid phase by changing its fatty acid composition. Absorption of the long-chain fatty acid by the human body depends on its position in the triacylglycerol molecule and on whether the diet contained calcium and magnesium. If the stearic acid is at the 2-position of the triacylglycerols, the resulting 2-monostearin is steadily absorbed. If, however, it is at the 1- or 3-position, it is released as free strearic acid and, in the presence of calcium and magnesium, it is released as free stearic acid and, in the presence of calcium and magnesium, it is poorly absorbed. Thus, the position of long-chain fatty acid in the triacylglycerol molecule is very important for calories.

For the production of low calorie fat, transesterification between triacetin and stearic acid using 1,3 specific lipase in a solvent free system was tried. Long chain fatty acids could be located mainly at the 1- and/or 3-position of the hydroxyl group of triacylglycerols by the lipase-catalyzed reaction. For the optimization of the optimal conditions of low calorie fat production, three reactor systems-open reactor system, closed reactor system and vacuum reactor system- and the reaction variables (e.g. the effects of initial water activity, molar ratio of substrates, stirring speed, and temperature) were investigated. Vacuum reactor system, which incorporated with the addition of water, was more feasible for the low calorie fat production than open reactor system or closed reactor system because of the effective elimination of byproduct, acetic acid. More than 85% of yield could be obtained at 80℃, 400 RPM, and molar ratio of 1:1.4 (triacetin,

50mmol: stearic acid, 70mmol) by 4% (w/w) Novozym 435 of substrates under vacuum system.

목 차

제 1 장 서 론

제 1 절 연구개발의 필요성

1. 연구개발의 필요성

가. 기술적 측면

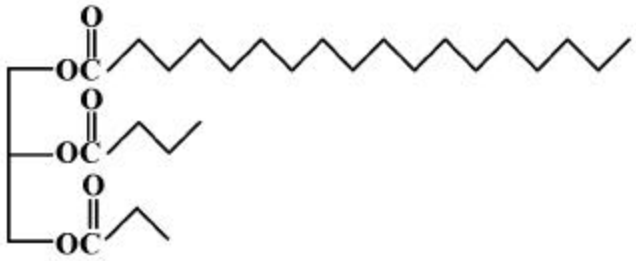
현재 시판되는 저 칼로리 유지는 표 1.에 정리되어 있으며 그 중에서도 대표적인 저칼로리 유지로서는 살라트림(Salatrim)과 카프레닌(Caprenin)을 들 수 있다. 살라트림은 장쇄지방산(long chain fatty acids: 탄소수 16-22의 포화지방산으로 주로 스테아르산(steacric acid C18)과 아세트산(acetic acid C2), 프로피온산(propionic acid C3), 뷰티르산(butyric acid C4)과 같은 단쇄지방산(short chain fatty acids)으로 구성된 구조 지질(structured lipid)이며 카프레닌은 장쇄지방산인 베헨산(behenic acid C22)과 중쇄지방산인 카프로산(C6)과 카프릴산(C8)으로 구성된 구조 지질이다 (그림 1). 살라트림은 Nabisco社와 Pfizer社가 공동개발한 저 칼로리 식물성 유지로 기존 유지의 절반인 5kcal/g의 열량을 가지고 있으며 기존의 지방대체유지로는 어려운 영양과 맛을 함께 양립한 획기적인 식품소재이므로 초코릿, 아이스크림, 과자류 등의 저 칼로리화에 가장 적합한 유지로 평가된다. Procter&Gamble사에서 생산한 카프레닌 역시 5 kcal/g의 열량을 가지고 있으며 아이스크림제조나 초코릿 제조 등에 사용되며 앞으로 그 용도가 더 확장될 것으로 전망하고 있다.

표 1. 시판되고 있는 저 칼로리 유지

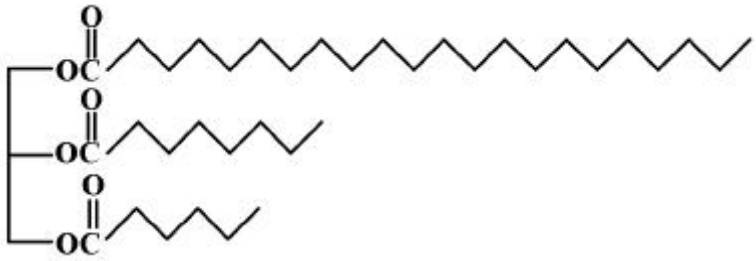
제품	조성	회사
카프레닌(Caprenin)	C6:0, C8:0, C22:0	Procter & Gamble, Cincinnati, Ohio
살라트림(Salatrim)	C3:0, C4:0, C18:0	Nabisco Foods Group, East Hanover, New Jersey
캅텍스(Captex)	C8:0, C10:0, C18:2	ABITEC, Columbus, Ohio
네오비(Neobee)	C8:0, C10:0, LCFAa	Stepan Company, Maywood, New Jersey

aLCFA=long chain fatty acids

현재 생산되어 시판되고 있는 저 칼로리 유지는 모두가 화학 합성으로 생산된 것이다. 화학합성의 경우 에너지의 소비가 크고 부반응이 많이 생기는 단점이 있다. 또한 이렇게 생겨나는 부반응물은 제거하기가 어렵고 반응 촉매와 더불어 인체 내에서 유해하므로 식품 소재를 생산하는 경우 이들의 분리는 필수적이다. 그러나 이들 부반응물과 반응 촉매의 분리가 어렵기 때문에 유해물질의 잔존량에 따르는 규제가 있을 수 있다. 효소반응의 경우 반응촉매가 인체에 무해하고 부반응물이 생기지 않으므로 쉽게 원하는 제품을 얻을 수가 있어 화학반응에서 문제가 되는 유해물질의 잔존량이 문제가 되지 않는다. 또한 효소반응은 상온 상압에서 반응하므로 에너지 소비가 적어 환경 친화적 측면에서도 바람직하다고 할 수 있다.



Salatrim structure



Caprenin structure

그림 1. Chemical structure of Salatrim and Caprenin

나. 경제·산업적 측면

현재 화학 합성으로 만들어지는 살라트림(Salatrim)의 가격은 kg당 2.2-4.4 US $이다. 그러나 화학합성의 경우 기존 생산 회사에서 거의 모든 공정이 최적화 되어 있고 이미 공정 특허를 낸 상태이기 때문에 국내에서 자체적으로 생산하지 못하고 전량 수입에 의존해야 한다. 전량을 수입하는 경우, 원래의 가격에 특허료와 운송료가 부과되어 원래 가격 보다 높은 가격인 kg당 9-18 US $에 판매되고 있는 실정이다. 따라서 현재 비교적 저렴한 가격으로 시판되고 있는 리파제를 이용하여 살라트림을 포함한 저 칼로리 유지를 생산하는 것은 매우 바람직하다. 왜냐하면 시판되고 있는 리파제의 가격이 대략 kg당 80-200$ 수준이고 일반적으로 산업화 수준 반응에 사용하는 효소량이 0.05-0.1%이기 때문에 순수하게 효소만을 원료비로 했을 때의 생성물의 가격을 평가하면 4-20 US $수준의 살라트림을 생산할 수 있으며 효소를 한번 재사용 할 경우 2-10 US $수준으로 생산물의 가격을 낮출 수 있고 또 한 번 더 사용하면 1-5 US $수준으로 화학반응과 경쟁력이 있는 가격대가 된다. 또한 효소 반응으로 생산된 저 칼로리 유지의 경우 원하는 지방산이 위치 특이성으로 결합할 가능성이 있으므로 기능성이 우수한 신제품을 만들 수 있어 고부가가치를 창출할 수 있다.

다. 사회·문화적 측면

서구에서는 칼로리의 40%에 이르는 음식물이 지방에 의해 제공된다. U.S. Surgeon General에서는 흡수되는 칼로리의 30% 미만만이 지방에 의해 제공돼야 한다고 추천하고 있다. 그래서 소비자에 의해 저지방 생산물에 대한 관심

이 증가되고 있고, 이는 식품 생산자가 식품에 감소된 칼로리의 지방을 함유시키려는 노력을 고무시켰다. 하지만 지방은 식품에서 높은 질과 감각적 만족과 밀접하게 연관되어 있어 식품업체들은 감소된 칼로리의 지방을 제공함으로써 이와 같은 문제를 해결하려는 시도를 해왔다.

현재 우리 나라에서도 국민소득이 높아짐에 따라, 육류나 고지방식품의 소비가 늘고 있는 추세이다. 또한 미국, 유럽문화의 영향으로 많은 유, 소년층이 점차 미국이나 유럽에서 개발된 고지방 식품들을 선호하고 있다. 그러므로 국내에서도 동맥경화와 같이 비만에 관련된 질병에 대한 불안감이 증가하고 있으며 이에 따른 저 칼로리 식품에 대한 선호도는 계속 증가될 전망이다. 미국에서는 1991년 이후부터 많은 소비자들이 저 칼로리 유지에 대한 기호도는 계속 신장하였고 그 이유는 표 2에 나타내었다. 따라서 저칼로리 유지의 개발과 이를 이용한 신제품의 개발은 국민의 "기호도와 건강"을 동시에 충족시킬 수 있을 것으로 생각된다.

표 2. 소비자가 저 칼로리 유지 식품을 찾는 이유

이 유	저지방을 찾는 소비자(%)
전체적인 건강을 유지한다.	84
체내 지방을 감소시킨다.	76
보다 유익한 식품을 먹고 마신다.	73
콜레스테롤 함량을 줄인다.	71
칼로리를 낮춘다.	66
날씬한 몸매를 유지한다.	60
몸무게를 유지한다.	58
몸무게를 줄인다.	48
맛이 있다.	42

source : Calorie Control Council 1993 national survey

2. 저 칼로리 유지의 기능

살라트림(Salatrim)의 물성은 mono-long chain triglyceride 및 di-long chain triglyceride의 상대량 및 이들 각 분자에 함유되어 있는 단쇄지방산(short chain fatty acid)와 장쇄지방산(long chain fatty acid)의 함량에 따라 결정된다. 이러한 다양한 지방산의 조합으로 생성된 살라트림은 종래의 옥수수유 같은 triglyceride 보다 그램 당 더 적은 칼로리를 제공한다는 것이 쥐에 관한 연구와 clinical study에서 밝혀졌다.

저 칼로리는 단쇄지방산이 제공하는 낮은 칼로리와 인체 내 효소 가수 분해에 의해 생성된 자유 장쇄지방산(e.g. free stearic acid)의 제한된 흡수에 의해 설명할 수 있다. 연소열에 관한 연구를 통해 acetic acid, propionic acid, butyric acid 같은 짧은 사슬의 지방산은 중사슬이나 긴사슬의 지방산 보다 더 낮은 칼로리를 제공함이 알려져 있다. 또 인간에 대한 임상 연구에서 살라트림에 있는 stearic acid의 27.6 - 36.5%가 흡수되는 것이 보여졌고, 4.7 -5.1 Kcal/g 의 칼로리 이용을 보였다. 즉, 자유 지방산으로서의 stearic acid는 인체에서 잘 흡수되지 않는다. 글리세롤(Glycerol) 분자의 1,3 위치에 에스테르화 되어 있는 stearic acid는 그 생물적 이용이 제한되어 있고 인체 내 효소(lipase)에 의해 잘 가수 분해되지 않는 2 위치에 에스테르화 되어 있는 monoglyceride 형태의 stearic acid는 거의 완전히 흡수되는 것으로 보인다. 그러므로 더욱 잘 가수 분해되는 글리세롤 1,3 위치에 stearic acid가 존재하는 지방에서 자유 stearic acid가 생산되고 이는 최소의 흡수와 함께 위장관을 통과하게 된다. 우지나 코코아 버터 같이 stearic acid가 풍부한 지방이 옥수수유 같은 전형적인 야채유보다 더 적은 칼로리를 제공하는 것도 이에 기인한 것이다.

살라트림(Salatrim)의 한 종류인 Salatrim-C는 sharp melting point, 즉 특정 온도에서만 녹는 성질과 non-tempering 특성을 가지고 있어 coating, inclusion 등에 적합하여 초콜릿 유지인 코코아 버터 대신 초콜릿 등에 이용하여 저 칼로리 화 할 수 있다.

Salatrim-M은 유지, 쇼트닝의 대체로서 아이스크림 등의 유제품 및 과자에 이용하여 칼로리를 낮출 수 있으며 사용하기 쉬운 액상 타입이다. 이러한 살라트림(Salatrim)의 구별은 살라트림 분자를 구성하고 있는 단쇄지방산과 장쇄지방산의 종류, 이들의 몰 비율 등에 따라 구별되어지며 서로 다른 기능을 가지게 된다. 화학적으로 이러한 살라트림(Salatrim) family를 생산하는 것보다 리파제 같은 효소를 사용하게 되면 보다 더 특이적으로 원하는 물성을 가진 살라트림(Salatrim)과 보다 더 낮은 칼로리를 제공하는 유지를 생산할 수 있게 된다. 또한 살라트림(Salatrim)은 fat의 기능을 흉내내는 탄수화물계, 단백질계 등에서 유래한 저 칼로리 지방대체물질과는 달리 진정한 지질성 물질로서 지질이 식품에서 이용되는 모든 기능을 보이는 저 칼로리 유지이다.(표 3.)

표 3. 살라트림(Salatrim)의 식품 이용성

초콜릿 향 코팅 (Chocolate-flavored coating	
칩 (Deposited chips)	
카라멜 (Caramel)	
토피 (Toffee)	
제과 (Filling for confectionery & baked goods)	
땅콩 스프레드 (Penut spreads)	
소스 (Dips & sauces)	
드레싱 (Savoty dressings)	
낙농제품 (Dairy products) -	크림 (Soyce cream)
	빙과류 (Frozen dairy dessert)
	치즈 (Cheese)

3. 리파제의 산업적 이용 및 구조적 고찰

효소는 생체 촉매(Bio-catalyst)로서 모드 생물체 내에서 필요에 따라 만들어져 각각의 특이성으로 생명체 내의 대사 작용을 맡고 있다.

촉매로서의 효소는 생체 내(*in vivo*)에서뿐만 아니라 화학 촉매와 마찬가지로 생체 외부(*in vitro*)에서도 기질과 조건이 적당하면 작용을 하는 특성이 있어서 최근 들어 효소의 생산과 이의 산업적 이용이 급속도로 확산 발전되어 왔다. 의료용 효소, 식품용 효소, 공업용 효소에 대한 시장이 적지 않게 형성되어 있고, 새로운 용도의 새로운 효소가 개발 상업화되어 응용되고 있다.

리파제는 triglyceride의 에스터(ester) 결합을 가수 분해하여 glycerol과 지방산으로 분해 또는 역으로 합성하는 작용을 하는 효소로 동물, 식물, 미생물에 의해 생산된다. 즉, 리파제 반응은 비가역 반응(irreversible reaction)이 아니라 가역 반응(reversible)으로서 반응계의 조건에 따라 정반응과 역반응을 일으킨다. 반응계 중 수분이 충분할 때는 가수 분해 반응을 일으키고,

효소의 활성을 유지할 최소한의 물만 존재할 때에는 에스터 합성 반응을 일으킨다. 따라서 리파제의 이러한 특성을 이용하여 반응 조건을 적절히 조절하면 고부가가치의 여러 가지 유용 물질을 선택적, 효율적으로 생산할 수 있다. 또한 기질의 특이성을 이용하여 화학적으로는 도저히 만들어 낼 수 없는 이성질체의 합성도 가능하다.

미생물 유래의 리파제의 경우 동물이나 식물에서 얻어지는 리파제에 비해 생산비가 훨씬 적게 들며, 계절이나 지역에 따른 제한 조건이 없고, 대량 생산이 가능하므로 산업적 잠재성이 크다. 미생물에서 분리한 리파제는 유지 산업과 식품 산업에서 널리 쓰이는 효소로서 지방의 제거 또는 구조 변화의 촉매로서 그 이용 범위가 날로 증가하고 있다. 예를 들어 우유에서 리파제에 의해 분리된 일종의 지방산은 치즈의 숙성과 향미에 중요하다. 특히 합성 세제의 엄청난 시장 규모에 비례하여 점차 증가하는 추세이다. 이러한 효소 세제의 중요성은 일반 세제의 환경 오염 문제에 비추어 그 연구 가지가 더욱 크다. 이외에도 리파제는 많은 반응의 촉매로 그 응용 범위가 확대되고 있다. 앞서 언급했던 식품 및 유지 산업 이외에도 가죽 처리 공정, 화장품 및 의약품, 특히 화장품의 경우 피부 지방 제거용 크림 생산에 응용된다. 두유, 알코올 음료, 쌀 가공 시 향과 맛의 향상에 이용되고 특수화학 분야에서 광학 활성을 갖는 물질 생산에 이용하는 등 리파제는 광범위하게 산업적으로 이용되고 있다.(표 4.)

표 4. 미생물 리파제의 산업적 이용

응용 분야	효 과	생 산 물
낙농제품	향기개선 버터지방 제거 탈지 우유 농축	치즈 치즈 관련 제품
육제품 가공	휘발 성향과 지방산 개선	햄, 소세지
어류 가공	과다 지방 성문 제거	어제품
쌀 가공	이취제거, 향미 증강	어제품
두유 가공	지방 변형	두유
양조 공업	향기 개선, 알코올 발효기 가속화	알코올 음료
유지 처리	유지의 가수 분해	지방산, Diglyceride, Monoglyceride
세제	유지 성분의 제거	세제
의약 분야	음식물의 유지 분해	소화제
화장품 생산	인체 피부 지방 제거	피부 지방 제거용 크림
가죽 처리 공정	지방 제거	가죽 제품
Miscellaneous	기름 성분 제거	폐수 처리제
껌제조 공정	구강 청정 개선	껌

미생물이 생산하는 리파제는 일반적으로 다음과 같이 분류할 수 있다. 우선 기질에 대한 반응 특이성에 따라서 다음과 같이 네 가지로 분류할 수 있는데, 첫째, 반응 위치 특이성(1,3-specific and non-specific), 둘째, 지방산에 대한 반응 특이성, 셋째 partial glycerides 분해 특이성, 넷째, 인지질 및 지단백질 분해 특이성 리파제로 분류된다.

반응 위치 특이성을 나타내는 리파제는 *Rhizopus javanicus* lipase, *Rhizopus riveus* lipase, *Aspergillus niger* lipase 등이 알려져 있으며, 지방산에 대한 반응 특이성을 나타내는 리파제는 *Mucor miehei* lipase, *Candida cylindracea* lipase, *Rhizopus arrhizus* lipase 등이 알려져 있다.

반응 위치 특이성을 갖는 1,3-specific lipase에 의한 가수 분해 반응의 생성물은 1,2(2,3)-diglyceride와 2-monoglyceride이고 non-specific lipase의 경우에는 1,2(2,3)-diglyceride와 1,3-diglyceride, monoglyceride가 모두 생성될 수 있다.

지방산에 대한 반응 특이성을 지닌 리파제는 불포화 지방산에 대한 친화가 포화 지방산에 대한 친화도 보다 훨씬 떨어져서 쇼가성물은 주로 포화 유리 지방산과 불포화 지방산을 주 구성요소로 하는 triglyceride, 1,2(2,3)-diglycerides, monoglycerides의 혼합물이다.

효소의 구조 연구 방법에는 pH와 농도, 온도를 조절하여 isomorphous crystal 이 형성되면 그 형상을 관찰하는 Crystallization 방법, 낮은 pH와 실온에서 실험하며 X-ray radiation을 조사하여 형성되는 image를 관찰하는 X-ray diffraction 방법, C-atom을 기본으로 하여 세련된 modeling을 하는 structure refinement 등의 방법 등이 있다.

4. 열분해 및 산화안정성

살라트림(Salatrim)은 보편적인 지방질과 비교했을 때 훌륭한 산화안정성을 가지며 이것은 ACM (active oxygen method) 시험을 통해 입증되었다. 따라서, 살라트림(Salatrim)은 일반유지와 같은 저장방식을 따라주면 된다. 그러나, 열분해 측면에서는 일반유지에 비해 떨어지기 때문에 자체적으로는 튀김용으로 부적합하나, 튀김용 유지에 섞어서 사용하는 것은 가능하므로 튀김용 저칼로리 유지를 만들 때 첨가제로 사용하여 그 요도를 넓혀 가는 것이 바람직하다.

5. 저 칼로리 유지의 산업화

효소를 이용한 저 칼로리 유지의 생산의 산업화를 위해서는 먼저 수율이 70% 이상이 되어야 하고 효소를 3번 이상 사용할 수 있어야 한다. 따라서, 이것을 현실화할 수 있는 pilot scale (5L)의 효소 반응기를 개발하는 것이 필요하다.

한편, 상업적인 측면으로는, 기존 유지제품들의 식품시장 접근 방법과는 달리 저 칼로리 식품의 차별화가 중요하다. 이를 통해 기존 유지 가공식품을 최대한 저 칼로리화하여 판매한다면 그 시장성을 크게 확대할 수 있다. 또한, 소비자들은 화학적으로 합성된 유지 제품보다는 효소적으로 생산된 유지 제품을 선호하는 경향이 있으므로 효소적으로 생산된 저 칼로리 제품 (Salatrim)의 산업화 전망은 매우 크다고 할 수 있다.

6. 국내외 관련 기술의 현황과 문제점

현재, 국내에서 저 칼로리 유지의 공급은 전량 수입에 의존하고 있으며 아직까지 자체 연구가 全無한 상태이다. 그러나 국내 식품회사는 외국의 기술을 그대로 도입할 경우 대량 생산 할 수 있는 능력을 갖추고 있다. 그럼에도 불구하고 기술 도입을 하지 않고 전량 수입에 의존하는 것은 국내수요가 기술 도입비와 장치비를 충당할 만큼 충분하지 못하기 때문이다. 또한 효소를 이용하여 저 칼로리 유지를 생산하는 경우에는 미국 일본 등 선진국들이 상당한 관심을 가지고 있다. 그 이유는 효소를 이용할 때 산업적 가치가 크고 아직까지 연구가초기 단계이므로 특허를 내기가 용이하기 때문이다. 본 실험실에서는 지난 10여년 동안 리파제를 이용하여 유화제, 코코아 버터 등 유지 관련 제품을 개발하였으므로, 이에 따른 분석 기술, 효소 고정화, 효소 반응기 개발에 대한 많은 KNOW-HOW가 축적되어 있다. 따라서 효과적으로 저 칼로리 유지의 수율을 높이고 산업화에 기여할 수 있다고 생각한다.

7. 앞으로의 전망

저칼로리 유지를 국내에서 자체 개발할 경우 기술도입비가 들지 않고 장치비를 절감할 수 있어 수입대체 효과를 가지고 있다. 또한 저 칼로리 유지로 만든 아이스크림, 초코릿, 과자류 등 관련 식품의 신장이 예상된다. 아직까지 국내에서 이와 같은 연구가 수행되지 못한 실정이다. 따라서 저 칼로리 유지의 생산에 대한 기초연구와 새로운 공정개발은 필수적이다.

제 2 절 연구개발 목표 및 내용

1. 연구개발 목표 및 내용

현재 많은 관심을 보이며 시장 점유율을 높이고 있는 저 칼로리 유지의 생산을 위해서 많은 단점을 가지고 있는 화학적 합성이 아닌 경제적, 생물학적 등으로 유리한 효소적 합성 반응을 이용한 개발을 수행한다. 즉, 가장 높은 수율을 보이는 효소 반응 system의 개발 및 선정 실험과 효소 반응 시 조절 인자(e.g. 기질의 몰 비율, 반응 온도, 반응 system의 초기 수분 활성도, 교반 속도 조절 등)들에 관한 실험을 통해 스케일-업에 필요한 기초 자료를 얻고 이를 토대로 파일롯 스케일(pilot scale)의 효소 반응기를 제작한다. 파일롯 스케일의 효소 반응기를 이용한 저 칼로리 유지 생산에서 반응 시스템에 가장 큰 영향을 미치는 조절 인자를 찾고 최적 생산 조건에 관한 연구를 수행한다.

또한, 새로이 개발된 저 칼로리 유지 생산 공정의 특허 출원을 하고, 출원된 공정을 가지고 실험한 후 경제성 평가를 한 후 산업화에 필요한 기초자료를 제공한다.

2. 연차별 연구개발 목표와 내용

구 분	연 구 개 발 목 표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 (1997)	최적 반응 조건의 확립	1. 적합한 효소의 screening 2. 효소 반응 시스템의 선정 open & closed system 3. 기질의 몰비의 영향성 4. 초기수분활성도의 영향성
2차 년도 (1998)	효율적,경제적 반응기 개발	1. 용매계반응과 비용매계반응의 비교 2. 저 칼로리 유지의 구조 분석 3. 온도, 교반속도, 효소의 양에 따른 반응 산물의 조성의 변화 4. acetic acid의 영향성 5. 효소의 재사용성 고찰
3차 년도 (1999)	스케일-업을 통한 제품 생산	1. 스케일-업에 필요한 기초자료 연구 2. 파일롯 스케일의 효소 반응기 제작 3. 파일롯 스케일에서의 저 칼로리 유지 생산의 최적화 연구

제 2 장 본 론

제 1 절 저 칼로리 유지 생산의 최적 반응 조건 확립

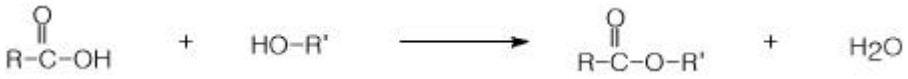
1. 서 론

현재 많은 관심을 보이고 시장 점유율을 높이고 있는 저 칼로리 유지의 생산을 위해서 많은 단점을 가지고 있는 화학적 합성이 아닌 경제적, 생물학적 등이 유리한 효소적 합성 반응을 이용하여 개발을 수행한다. 우선 저 칼로리 유지 생산에 필요한 효소와 반응을 선정하기 위하여 상업적으로 시판되고 있는 여러 효소를 반응기키는 선별 실험을 하며 저 칼로리 유지를 높은 수율로 합성하기 위한 트랜스 에스테르화 반응(transesterification), 아시돌리시스 반응(acidolysis), 알콜리시스 반응(alcoholysis) 등의 효소 반응 방법을 수행하여 알맞은 반응을 선택한다. 다음 그림 2.는 리파제에 의해 oil이나 fat의 물성과 영양학적 성질을 개선하기 위해 분자 구조나 조성을 변형시키는 반응들을 나타낸다.

인체에 유해한 용매를 사용하지 않아 공정의 간소화, 식품 안정성의 문제 등에 장점이 있는 비용매 시스템(Solvent free System)을 도입하였으며 저 칼로리 유지 생산에 필요한 효소와 반응을 선정하기 위하여 여러 상업적으로 시판되는 다양한 효소들을 이용하여 반응을 수행한 결과, 본 반응의 특징인 비용매 시스템에서의 70℃ 정도에서도 활성이 강한 Novozym 435, Lipozym IM 등을 선별하였으며 자체적으로 제작한 반응기에서 효소 반응의 최적조건을 잡기 위하여 기질의 선택, 반응기내의 온도, 반응기내의 rpm, 반응의 양상과 생산성에 영향을 주는 수분활성도의 조절, 기질의 몰 비율(molar ratio) 등을 실험하였다.

· Hydrolysis of Ester

· Synthesis of Ester



· Transesterification

- Acidolysis

- Alcholysis

- Ester Exchange(Interesterification)

- Aminolysis

그림 2. Types of reaction catalyzed by lipase

또한 반응 생산물의 효율적인 분석을 위하여 온 칼럼 인젝션 시스템(on-column injection system)을 이용한 GC분석 기술을 도입하여 보다 정확한 분석 결과를 얻을 수 있었다.

효소, 즉 리파제를 이용하여 저 칼로리 유지를 생산하는 방법에는 모노글리세라이드(monoglyceride)에 지방산을 결합시키는 에스테르화 방법, 짧은 지방산을 함유한 트리글리세라이드(triglyceride)와 긴 지방산을 함유한 트리글리세라이드를 반응시켜서 원하는 지방산 구성을 가지는 유지를 생산하는 트랜스 에스테르화 반응, 트리글리세라이드와 지방산을 반응시키는 아시돌리시스 반응 등의 합성 방법 등이 존재한다.

본 실험에서는 짧은 지방산을 함유한 트리글리세라이드와 긴 지방산과의 아시돌리시스 반응을 통하여 저 칼로리를 가지는 구조지질을 생산하는 방법을 수행하였다.

2. 연구 내용

본 연구는 저 칼로리 유지인 살라트림의 제조 방법에 관한 것으로 더욱 상세하게는 효소를 이용한 지방산들과 글리세라이드류들의 에스테르화 반응 및 트랜스에스테르화 반응을 통해 살라트림을 합성하는 제조 방법에 관한 것이다.

살라트림은 구조 지질(structured lipid)로서 글리세롤(glycerol)부분에 한 개 이상의 단쇄 지방산(short-chain fatty acid)과 한 개 이상의 장쇄 지방산(long-chain fatty acid)을 함유한 구조를 취한다. 살라트림은 보통의 유지 열량보다 낮은 4.7 - 5.1kcal/g의 열량을 가지며 지방산의 조성과 함량에 따라 다양한 물리적 성질을 가질 수 있다.

살라트림의 제조에 있어서 상업적으로 시판되는 다양한 리파제를 이용하여 합성 반응을 수행하였으며, 살라트림 합성에 사용되는 기질에 따라 다양한 효소

반응이 이용될 수 있다. 장쇄 지방산을 함유한 모노 글리세라이드(monoglyceride)와 단쇄 지방산과의 합성반응, 장쇄 지방산을 함유한 트리글리세라이드(triglyceride) 와 단쇄 지방산과의 합성 반응,단쇄 지방산을 함유한 트리글리세라이드와 장쇄 지방산과의 합성 반응, 단쇄 지방산을 함유한 트리글리세라이드와 장쇄 지방산을 함유한 트리글리세라이드와의 합성 반응 등이 있다.(표 5.)

표 5. Strategies for the enzymatic synthesis of structured lipid

Direct Esterification
Glycerol + SCFA + LCFA → Structured lipid + Water
Glycerol + MCFA + LCFA → Structured lipid + Water
Transesterification
Ester interchange
SCT + LCT → Structured lipid
MCT + LCT → Structured lipid
LCT + SCFAEE → Structured lipid + LCFEE
LCT + MCFAEE → Structured lipid + LCFEE
SCT + LCFAEE → Structured lipid + SCFAEE
MCT + LCFAEE → Structured lipid + MCFAEE
Acidolysis
SCT + LCFA → Structured lipid + SCFA
MCT + LCFA → Structured lipid + MCFA
LCT + MCFA → Structured lipid + LCFA

SCFA : short-chain fatty acid. MCFA : medium-chain fatty acid. LCFA : long-chain fatty acid. SCT : short-chain TAG. MCT : medium-chain TAG. SCFAEE : short-chain fatty acid ethyl ester. MCFAEE : medium-chain fatty acid ethyl ester. LCFAEE : long-chain fatty acid ethyl ester.

각각의 합성 반응에서 기질(substrate)의 종류와 몰비율(molar ratio)에 따라서 다양한 종류의 살라트림을 합성할 수 있다. 이러한 합성 반응은 유기 용매 시스템(solvent system) 과 비 용매 시스템(solvent free system) 을 이용할 수 있다. 반응에 참여하는 기질 중에 탄소수 18(C18)이상의 포화 지방산과 트리글리세라이드류들은 상대적으로 높은 융점을 가지고 있다. 이러한 경우 핵산(hexane) 과 같은 유기 용매를 반응기에 첨가하여 기질을 녹인 후 반응을 시키면 비교적 낮은 온도에서 합성 반응을 수행할 수 있다. 또한 반응 온도를 기질의 융점 이상으로 높여 반응을 수행하여 비 용매 시스템을 수행할 수도 있다. 이러한 비 용매 시스템의 경우 용매의 유해 문제, 제거 문제들을 해결할 수 있다. 비 용매 시스템에서는 온도를 70℃ 정도까지 올려주므로 높은 온도에서도 활성(activity)이 좋은 효소가 필요한데 본 합성 반응에서는 Novozym 435 효소와 Lipozym IM 효소를 이용하는 방법을 개발하였다.

Structured lipid 합성에 있어서 수분의 영향은 반응의 양상에 영향을 주게 된다. 트리글리세라이드의 가수 분해, 글리세라이드와 새로운 지방산과의 re-esterification의 반응에서 적절한 수분의 함량은 반응의 수율과(yield) 생산성(productivity)에 영향을 주므로 본 발명에서는 수분 활성도(water activity) 의 개념을 도입하였다. 즉, 기질과(substrate) 효소(enzyme)의 초기 수분 활성도(initial water activity)를 조절함으로써 반응 효율을 극대화 할 수 있다. 또한 반응 시스템에 염수화물을 첨가하는 방법 또는 물을 첨가하는 방법등의 조작을 통해 살라트림의 합성을 시도하였다. 즉, 기질과(substrate) 효소(enzyme)의 초기 수분 활성도(initial water activity)를 조절함으로써 반응 효율을 극대화 할 수 있다. 또한 반응 시스템에 염수화물쌍을 첨가하는 방법 또는 물을 첨가하는 방법 등의 조작을 통해 살라트림의 합성을 시도하였다.

본 연구에서 살라트림 제조를 위해 사용한 반응은 리파제의

transesterfication 반응으로 short chain triglyceride(Triacetin)와 long chain fatty acid(stearic acid)을 기질로 사용하였으며 반응식은 아래와 같다. 즉, 일단 triacetin이 가수 분해 되어 mono-acetin이나 di-acetin으로 전환되고 이어 stearic acid와 re-esterfication 되어 글리세롤 분자에 하나 이상의 단쇄지방산과 장쇄지방산이 존재하는 구조 지질이 합성되는 것이다.

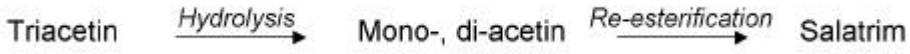


그림 3.은 triacetin과 stearic acid의 enzymatic transesterfication 반응의 schematic diagram을 나타낸다.

앞서 언급한 바와 같이 stearic acid가 글리세롤 분자의 2 번째 위치에 존재하게 되면 1,3 위치에 존재하는 경우 보다 훨씬 더 많은 체내 흡수가 일어난다. 따라서 AAS 나 SAS가 ASA 나 ASS 보다 칼로리 측면에서 더 유리하다.

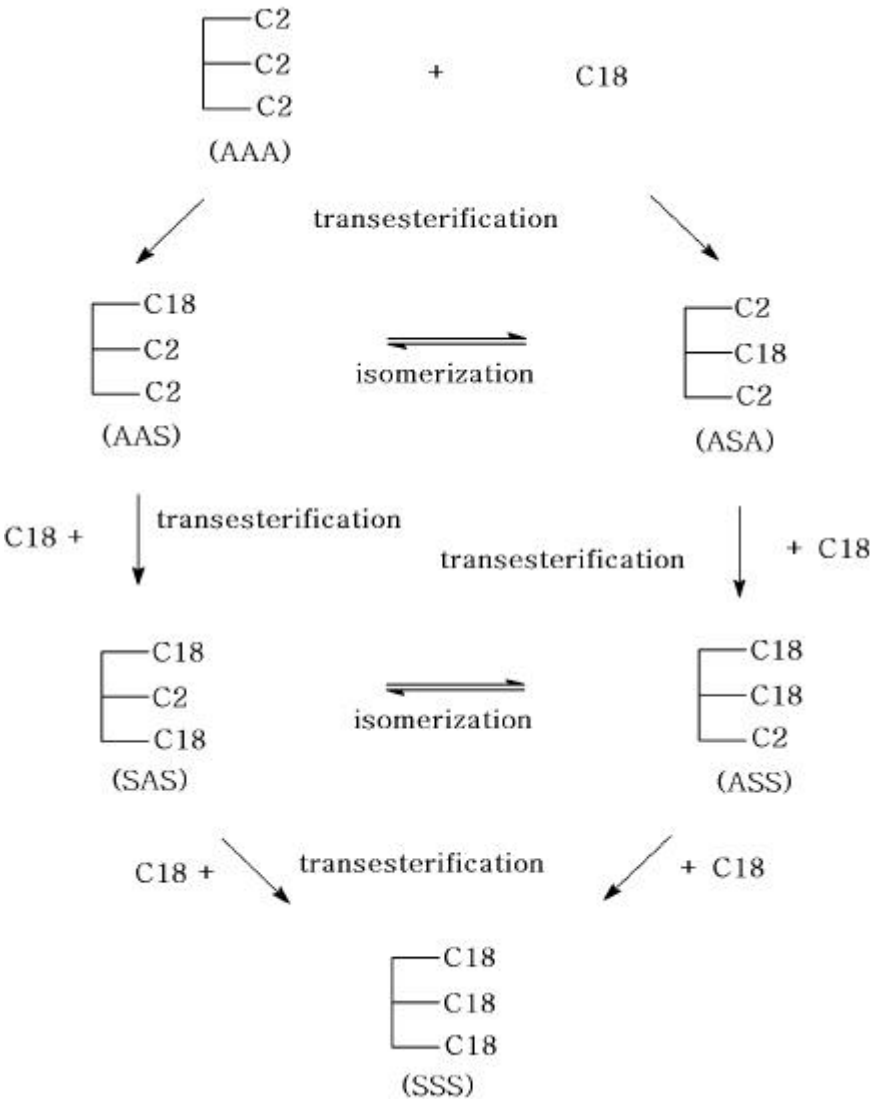


그림 3. Enzymatic transesterification of triacetin(AAA) and stearic acid(C18)

AAS : 1,2-diacetyl-3-stearoylglycerol,

ASA : 1,3-diacetyl-2-stearoylglycerol,

SAS : 1,3-distearoyl-2-acetylglycerol,

ASS : 2,3-distearoyl-1-acetylglycerol,

SSS : Tristearin.

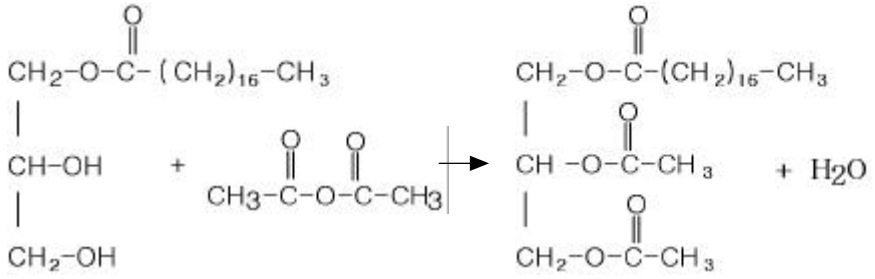
3. 연구 결과

가. 표준 물질 제조 및 분석 조건

효소를 이용한 저 칼로리 생산에 있어서 반응 산물의 동정을 위하여 표준 물질을 화학적인 방법으로 제조하였으며 제조 방법은 그림 4.와 같다.

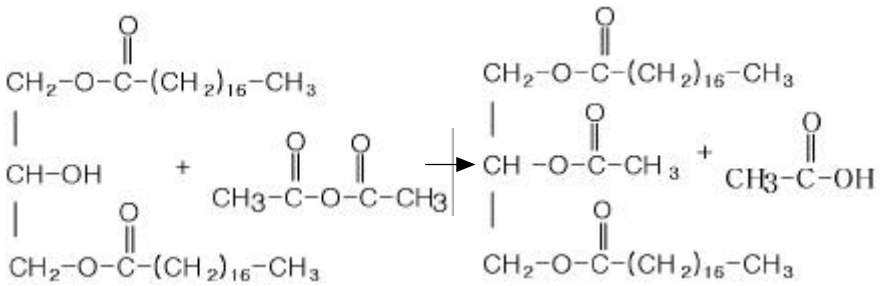
다이아세틸 스테아로일 글리세롤(Diacetylstearoylglycerol)을 제조하기 위하여 순환식 응축기가 달린 둥근 바닥 플라스크에 1-모노스테아린(1-monostearin) 과 아세틱 안하이드라이드(acetic anhydride)를 넣고 138 ℃에서 12시간 동안 마그네틱 바를 돌리며 반응하여 표준 물질인 Diacetyl-stearoylglycerol을 제조한다. 또 다이스테아로일 아세틸 글리세롤(Distearoylacetylglycerol) 역시 순환식 응축기가 달린 둥근바닥 플라스크에 1,3-다이스테아린(1,3-distearin) 과 아세틱 안하이드라이드(acetic anhydride)를 넣고 145 ℃에서 12시간 동안 마그네틱 바를 돌리며 반응하여 표준 물질인 Distearoylacetylglycerol을 제조하였다.

이렇게 제조한 표준 물질의 정확한 구조를 확인하기 위하여 ^{13}C NMR과 ^{1}H NMR 분석을 수행하였다. 분석 결과 화학적으로 제조한 물질은 Diacetyl-stearoylglycerol과 Distearoylacetylglycerol임이 판명되었고 이들을 이용해 GC chromatogram의 표준 곡선을 만들고 효소 반응 산물의 동정에 사용하였다.



1-Monostearin Acetic anhydride 1-stearoyl-2,3-acetylglyceride

Round bottom flask equipped with magnetic stir bar and reflux condenser 137deg, 12hr.



1,3-Distearin Acetic anhydride 1,3-Diacetyl-2-acetylglyceride

Round bottom flask equipped with magnetic stir bar and reflux condenser 145deg, 8hr.

그림 4. Chemical method for the synthesis of Diacetylstearoylglycerol and Distearoylacetylglycerol

저 칼로리 구조 지방질의 생산을 위한 효소 반응에서 반응 산물의 분석은 Gas Chromatography를 사용하였으면 다음 표 6.은 분석 조건을 나타내고 그림 5.는 반응 산물을 분석했을 때의 GC chromatogram이다. On-column injection system을 사용한 GC 분석으로 인하여 그림에서 보는 바와 같이 stearic acid가 글리세롤 backbone에 incorporation 되어 있는 위치에 따른 isomer 간의 분리, 즉 AAS와 ASA와의 분리와 SAS와 ASS와의 분리도 이루어져 보다 정확한 분석을 수행할 수 있었다.

표 6. The conditions of GC analysis

GC 분석기	HP 5890 series Ⅱ with temperature programmed capillary on column inlet system.
Temperature program	Initial temperature : 100℃ Initial time : 3 min Rate : 10℃/min Final temp A : 360℃ Final time A : 5 min Final temp B : 365℃ Final time B : 0 min
Detector Temperature	360℃
GC Column	High temperature fused silica capillary column bonded methyl 65% phenyl silicone 25m length, 0.25mm I.D, 0.1 ㎛ film thickness
Carrier gas	N2
Inlet pressure	164kpa
Integrator	HP 3396 series Ⅱ.

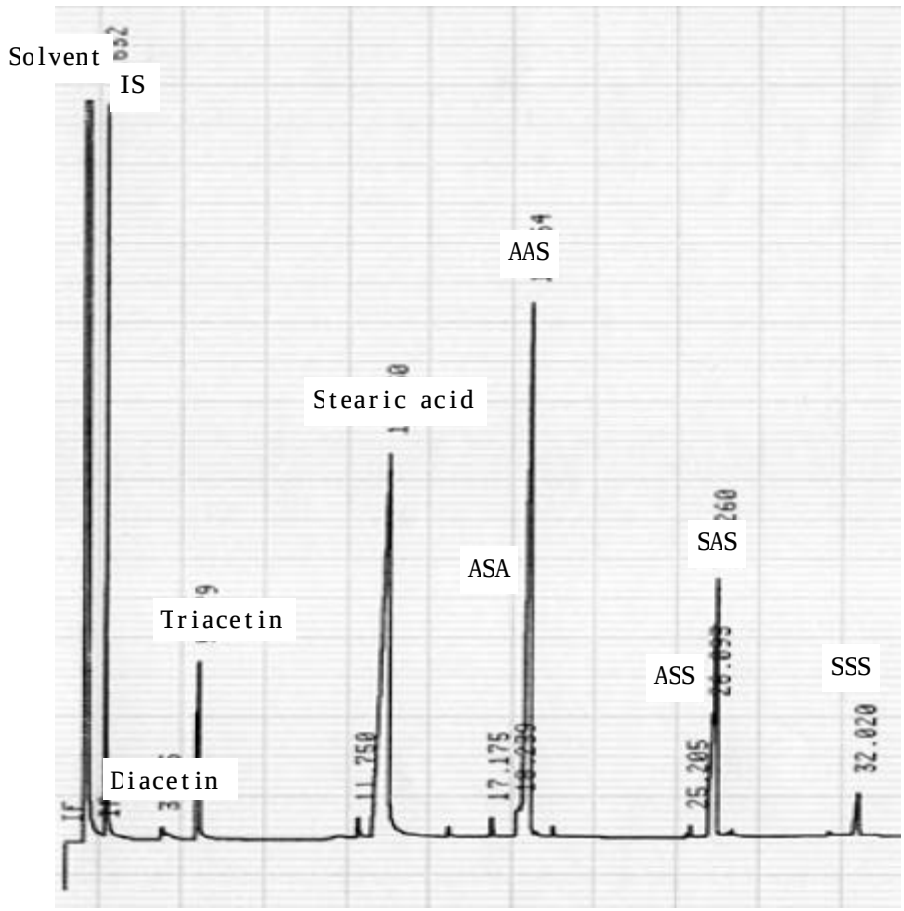


그림 5. GC Chromatogram HP 5890 series Ⅱ with temperature programmed capillary on column inlet system

▶ Oven : Inlet temperature ; 100℃, Initial time : 3 min, Rate : 10℃/min, Final temp. A : 360℃, Final time A : 5 min, Final temp B : 365℃

▶ Detector temp : 360℃

▶ GC column : High temperature fused silica capillary column bonded methyl 65% phenyl silicone 25m length, 0.25mm I.D, 0.1 ㎛ film thickness

▶ Carrier gas : N2 gas

▶ Inlet pressure : 164kPa

나. 효소(lipase)의 screening

저 칼로리 유지인 살라트림의 효소적 생산을 위하여 상업적으로 이용 가능한 여러 가지 리파제를 동일한 효소 반응 조건에서 실험하였고, 합성 반응 즉, transesterfication 반응에 사용했을 때의 결과는 표 7. 과 같다.

효소 반응 시의 기질 특이성, 반응 온도에 대한 열안정성 등을 고려하여 Novozym 435를 선정하였으며 선별 실험에서도 다른 효소에 비해 월등히 높은 수율을 나타냈으며 반응도 무척 빨리 진행되었다.

다. 초기 수분 활성도에 따른 반응 양상

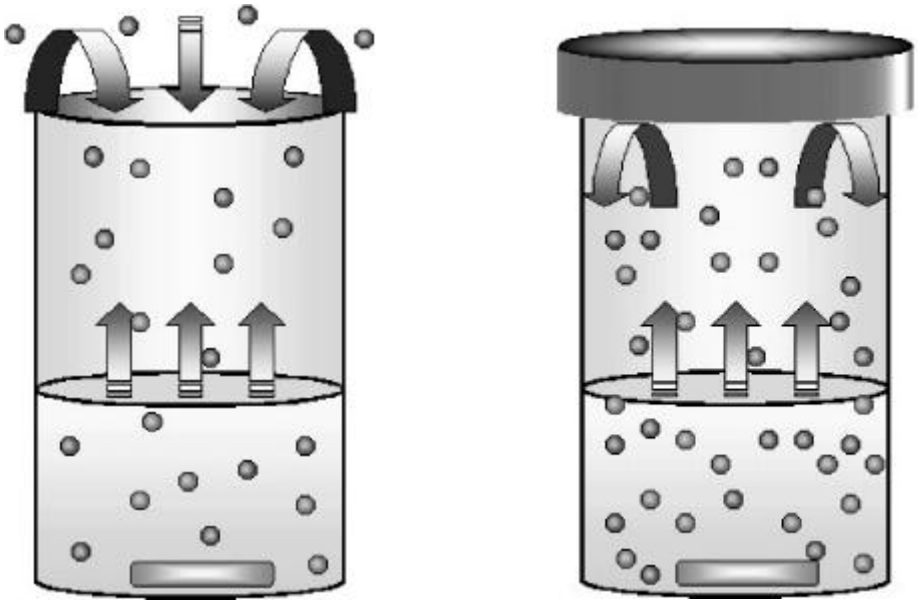
폐쇄 반응기 (Closed reactor system)과 열린 반응기 (Open reactor system)를 살라트림 생산을 위한 효소 반응 시스템으로 이용하였다. 폐쇄 반응기의 경우 초기에 반응기에 넣어준 기질과 효소에 의해 반응이 진행되는 동안 생성된 산물의 양이 반응이 끝날 때까지 변하지 않으나 열린 반응기의 연우는 그렇지 않다. 즉, 효소 반응 중 생성되는 acetic acid나 수분 등이 대기 중으로 확산되어 나가거나 대기 중의 수분이 반응 시스템에 흡수 되기도 한다.(그림 6.)

효소 반응에 사용되는 기질과 리파제의 초기 수분활성도의 조절은 이미 수분 활성도를 알고 있는 포화 염용액이 들어있는 밀폐 용기에 상온에서 7일간 방치하여 기질과 효소가 포화 염용액과 평형에 도달하도록 한다. 또 각 기질과 리파제의 수분 활성도는 Novasina aw center (Switzerland, range 0-100%, 0-50℃)로 수분 활성도를 측정하여 평형에 도달하였음을 확인한다.

표 7. Screening of lipases for the synthesis of salatrim

Name	Source	Reaction yield (%)
Novozyme 435	*Candida antarctica*	60
Lipozyme IM	*Mucor miehei*	15
Lipase CF	*Candida cylindraceae*	n.s
Lipase CES	*Pseudomonas spp.*	n.s
Lipase P		n.s
Lipase	*Bacillus stearothermophilus*	n.s
Lipase	*Candida rugosa*	n.s
Lipase Rohm 7023C	*Fungal origin*	n.s
Lipase R	*Penicillium roqueforti*	n.s
Lipase G	*Penicillium cyclopium*	n.s
Lipase PS	*Pseudomonas fluorescence*	n.s
Lipase CE	*Humicola lanuginosa*	0
Lipase D	*Rhizopus delemar*	0
Lipase M	*Mucor javanicus*	0
Lipase AP	*Aspergillus niger*	0

Reaction mixture consists of 6mmol triacetin, 6mmol stearic acid, 0.15g internal standard(nonadecane) and 0.15g of various enzymes. Reaction yield = (diacetylstearoyl glycerol + disteaaroylacetyl glycerol mmol)/ Triacetin mmol %. n.s : not significant.



Open reactor system　　Closed reactor system

그림 6. Comparison of open reactor system and closed reactor system

Open system과 closed system에서 동일 실험 조건으로 미리 수분 활성도를 맞추어둔 기질과 효소를 반응시켜 반응물을 분석하였다. 먼저 closed system의 경우 초기 수분활성도가 0.78 부근 일 때 가장 높은 수율을 나타내었다. 이는 triacetin이 먼저 가수분해되어 stearic acid가 결합되기 위한 자리를 제공하기 위해 어느 정도 수분이 필요함을 알 수 있다. 하지만 open system의 경우에는 초기 수분활성도가 그리 큰 영향을 미치지 못하였는데, 이는 반응이 진행되는 동안 대기 중의 수분이 반응물로 들어가기도 하고 반응 중에 생성된 수분이 대기 중으로 확산되기고 하는 대기와 효소 반응 시스템과의 교류가 있기 때문이라 생각할 수 있다. (그림 7., 그림 8.)

Open system과 closed system의 효소 반응을 동일 조건에서 수행하였을 때, open system의 경우가 closed system의 경우 보다 훨씬 더 반응 수율이 좋았다.(그림 9.) 이것은 open system의 경우 반응 부산물로 생성된 acetic acid가 대기 중으로 확산되어 반응 시스템의 pH에 영향을 많이 미치지 않는데 반해 closed system의 경우는 생성된 acetic acid가 반응 시스템 밖으로 빠져나가지 못하고 반응물에 계속 존재하여 반응 시스템의 pH을 낮추기 때문이다. 즉, acetic acid의 존재로 인하여 반응 시스템 전체의 pH가 낮아지고 이는 효소의 생화학적 구조와 활성에 악영향을 끼치기 때문이다. 또 stearic acid가 esterication 되어야 할 위치에 다시 acetic acid가 incorporation되는 역반응도 일어날 가능성이 높아진다.

따라서 저 칼로리 생산을 위한 효소 반응 시스템으로는 open system이 적당하다고 생각되며 초기 기질(triacetin)의 가수 분해를 위해 일정량의 수분이 반드시 필요함을 알 수 있다.

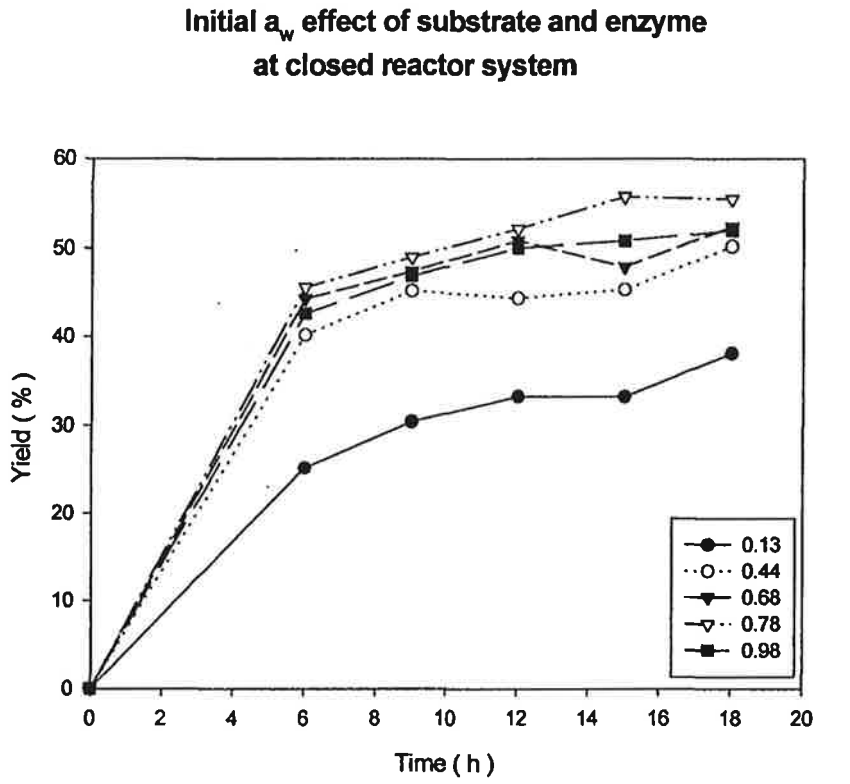


그림 7. Initial water activity effect of substrate and enzyme at closed reactor system

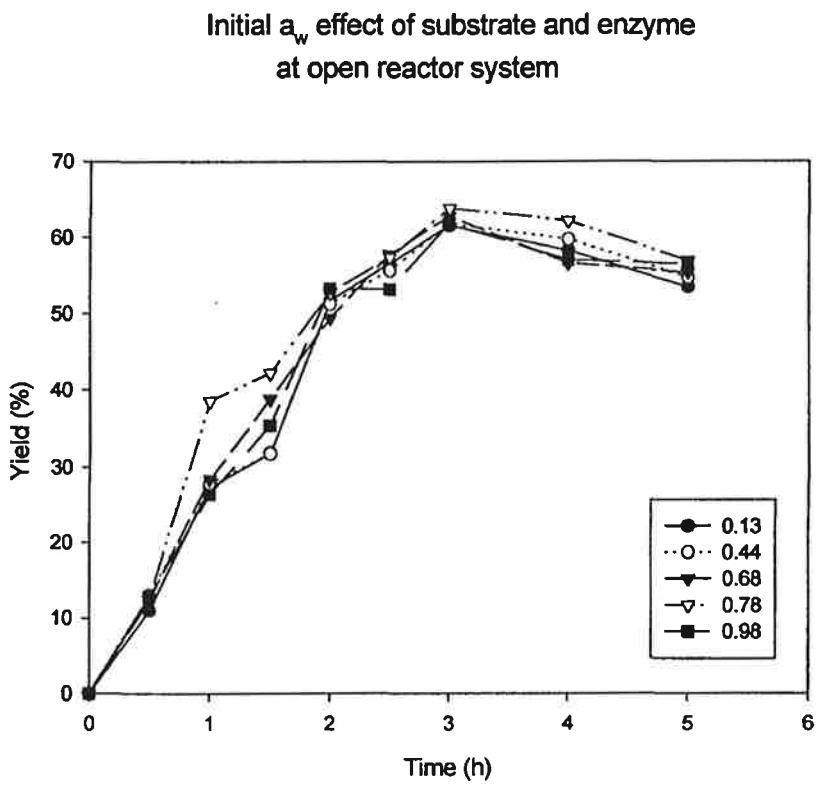


그림 8. Initial water activity effect of substrate and enzyme at open reactor system

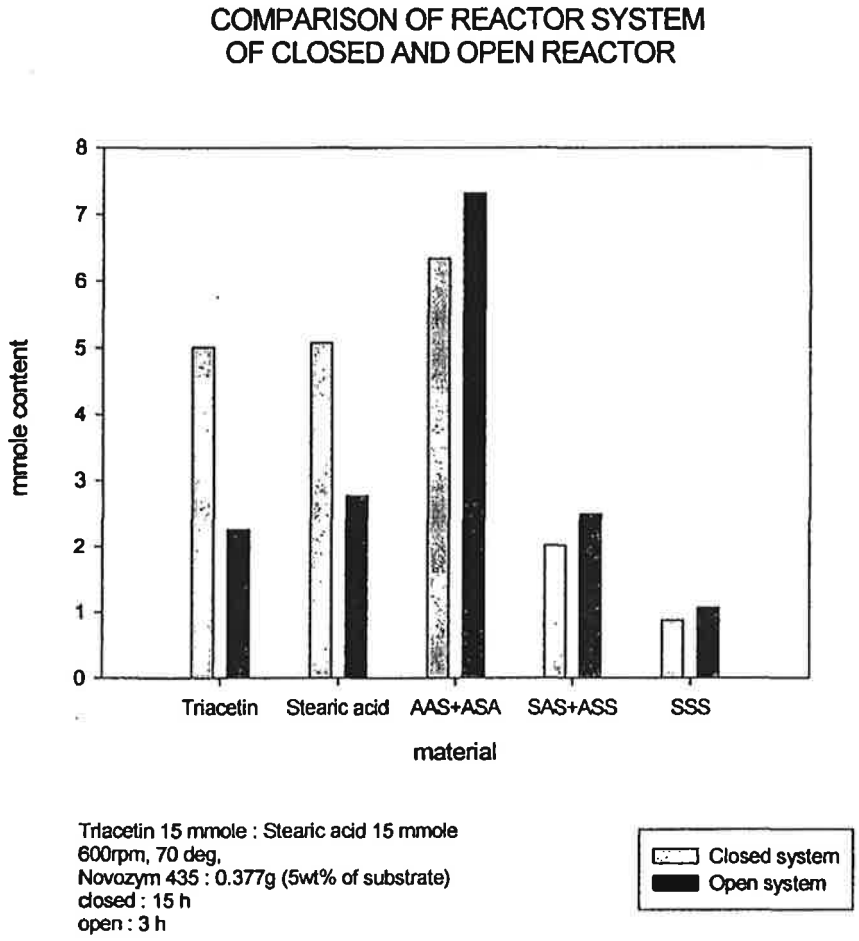


그림 9. Comparison of the product yield in a closed reactor system and an open reactor system

라. 기질(Triacetin and stearic acid)의 몰 비율에 따른 반응 양상

기질 몰 비율을 0.6 - 1.4 : 1 (Stearic acid : triacetin) 범위에서 실험한 결과 1.4 : 1 (Stearic acid : triacetin) 일 때의 반응 수율이 가장 높게 나왔다. 만약 기질의 몰 비율이 1.4 : 1 이상으로 하면 즉, stearic acid의 양을 1.4 이상으로 사용하면 반응이 계속 진행되어도 반응에 참여하지 못하고 남는 stearic acid가 많이 존재하게 때문에 제품으로서 적합하지 못하게 된다.(그림 10.)

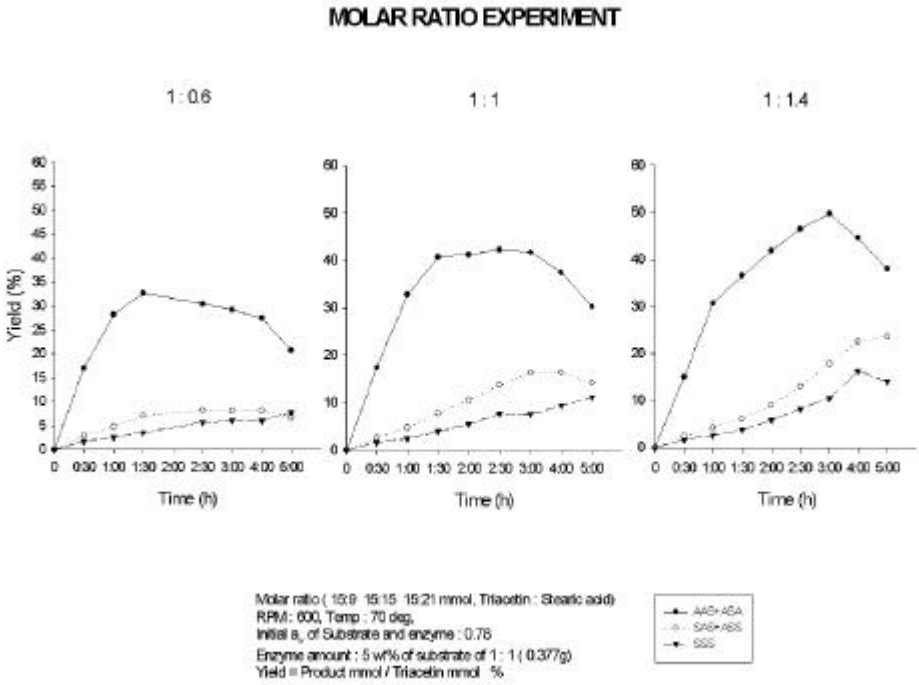


그림 10. The effect of substrate molar ratio on the synthesis of salatrim

제 2 절 효율적, 경제적 반응기 개발

1. 서 론

저 칼로리 유지 생산의 최적의 반응조건 결정을 위해, 용매계 반응(solvent system)과 비용매계 반응(solvent-free system)의 비교와 온도, 교반 속도(stirring spped), 효소의 양에 따른 반응 산물의 조성의 변화를 고찰하였다.

인체에 유해한 유기용매(organic solvent)를 사용하지 않으므로 공정의 간소화, 식품 안정성의 문제 등에 장점이 있는 비용매 시스템 (Solvent free system)을 도입해 유기용매 시스템과 비교하였으며, 자체적으로 제작한 반응기에서 효소반응의 최적조건을 구하기 위하여 반응기 내의 온도, 교반 속도와 효소의 양, 잔존하는 아세트산의 양에 따른 산물의 조성의 변화를 관찰하여 저 칼로리 유지인 살라트림(Salatrim)의 고수율 생산을 시도하였다. 또한 반응 생산물의 효율적인 분석을 위하여 Cn-column injection GC system과 TLC plate system 그리고 NMR을 이용하였다.

용매계와 비용매계 반응의 비교를 위해 효소 반응 온도, 교반 속도, 반응 시간 등의 반응 조건을 일정하게 하고, 용매의 사용, 비사용 시의 반응 수율을 비교하였다. 반응 수율은 생산된 Salatrim의 mmol percentage를 이용하였다.

또한 위치 이성질체(positional isomer)의 함량변화를 조사하기 위해서, 시간에 따른 표본 채취를 열린 반응기(open reactor system)에서 수행하였다. Mono-long 이성질체와 di-long 이성질체를 GC column에 의해 분석하였다. 그리고 반응이 진행되는 동안 반응기내의 온도의 변화를 조사하였고, 교반 속도의 영향을 비교하기 위해 여러 rpm에서 실험을 진행하였고, 효소의 양도 변화

시켜 산업화를 위한 scale-up에 대한 고찰을 수행하였다.

또한 아세트산(acetic acid)이 살라트림의 생산 수율에 미치는 영향을 관찰하기 위해 vacuum을 이용한 아세트산의 제거 실험을 진행하였다.

2. 연구 결과

가. 용매계 반응(Solvent system)과 비용매계 반응(Solvent-free system)의 비교

용매계 반응은 비용매계 반응에 비해 많은 단점을 가지고 있기 때문에 비용매계 반응으로 살라트림을 생산하려 시도하였으나 살라트림 생산 수율에 있어 비용매계 반응과의 수율을 비교하기 위해 용매계 반응 역시 조사해 보았다. 용매계 반응에 사용하는 유기용매는 logP 값에 따라 isooctane(4.5), hexane(3.5), benzene(2)를 사용하였다. 15ml의 용매가 각 반응기에 주입되었고, 비용매계 반응 (open system and closed system)도 반응 수율을 비교하기 위해 수행되었다. 용매계 반응은 closed reactor system에서 수행되었으며 모든 다른 반응 조건은 각 반응에서 동일하게 유지되었다. 기질은 15mmol triacetin과 15mmol stearic acid가 사용되었고, 반응조건은 70℃, 600rpm에서 3시간 반응하는 것이었다. 반응 수율은 생산된 salatrim mmol percentage로 비교되었다. 용매계 반응과 비용매계 반응의 생산 수율을 비교해 보았을 때, 용매는 효소적 합성의 반응 profile에 영향을 주었다. 표 8.은 리파제에 의한 salatrim 의 합성에 대한 용매의 영향을 나타낸 것이다. 비용매-열린 반응계가 salatrim의 합성에 가장 좋은 조건이었다. 그러나 비용매 폐쇄 반응계의 경우에는 salatrim의 생산 수율이 용매계의 것보다 낮게 나타났다. 이것

은 반응 혼합물의 소수성과 친수성이 salatrim의 생산수율에 영향을 미친 다는 것을 의미한다. 그러나, 반응 수율은 반응 혼합물 속의 아세트산에 의해 더 영향을 받는 것으로 추측된다.

표 8. Comparison of the product yield in a solvent system and a solvent-free system

	Diacetylstearoyl glycerol	Distearoylacetyl glycerol	Tristearin	Total Salatrim
Open*	41.15	17.99	7.50	59.14
Closed*	28.61	6.56	2.38	35.17
Isooctane	36.92	9.86	2.78	46.78
Hexane	35.06	8.43	3.27	43.49
Benzene	35.89	7.44	2.84	43.33

* : solvent-free system, triacetin : stearic acid = 15 : 15 (mmol), 600 rpm, 70℃, novozyme 435 : 377g(5 wt% of substrate), reaction time : 3h, solvent : 15ml

log P value-isooctane : 4.5, hexane : 3.5, benzene : 2.0

Yield = product mmol/triacetin mmol(%)

나. 반응 온도. 교반 속도(stirring speed), 효소의 양에 따른 영향성

기질의 몰 비율을 1.4 : 1 (Stearic acid : triacetin)로 고정시킨 open system에서의 효소 반응을 각 온도 별로 수행하였다. 기질로 사용되는 stearic acid의 융점(melting point)이 약 70℃ 정도이기 때문에 비 용매계에서의 효소 반응을 수행하기 위해서는 이보다 높은 온도에서 반응을 수행해야 했다.

효소 반응을 각각 70℃, 75℃, 80℃, 85℃에서 수행한 결과 반응 초기(약 1.5 시간)에는 온도 변화에 관계없이 효소의 transesterfication activity가 변하지

않았으나, 즉 생산물 수율에 있어 큰 변화를 보이지 않았으나 반응이 진행됨에 따라 생산물 수율은 온도 증가와 비례하여 증가하였다.(반응 2시간 후부터 5시간까지) 하지만 온도가 증가함에 따라 반응 부산물로 볼 수 있는 tristearin의 형성 속도 역시 증가하였다. 그림 11.은 효소 반응 profile을 반응식으로 나타낸 것인데, 만약 효소의 특이성이 이와 같다면 속도 결정 단계는 tristearin의 형성 단계 (k3)이다. 그러나 온도가 올라감에 따라 tristearin 형성 단계의 값도 증가한다. 반응 시간 4시간을 예로 든다면 85℃에서의 tristearin의 수율은 70℃에서의 수율의 두 배였다. 이와 마찬가지로, 반응 4시간 뒤의 85℃에서의 distearolacetylglycerol의 수율은 75℃에서의 수율의 한배 반이었다. 온도가 증가함에 따라 k값도 변했다. 따라서 살라트림의 생산 속도 및 생산 수율과 반응 부산물인 tristearin의 생성을 고려하여 효소 반응 온도는 80℃가 적당하다고 생각되며 이 때의 생산물 최대 수율은 약 75% 였다.

효소 반응 시스템의 external diffusion을 조사하는 stirring speed (rpm) 실험을 수행하였다. 200rpm, 400rpm, 600rpm에서의 효소 반응 결과 높은 rpm에서 빠른 반응 시간을 보였으나 실제 파일롯 스케일을 고려할 때 600rpm 이상에서는 현실화가 어려우므로 그 이하에서 생산을 하여야 실질적일 것으로 생각된다.

반응 3시간까지는 교반속도의 효과로 인해 수율이 증가되었다. 그러나, 반응 4시간 뒤에는 수율 상황이 변했다. 600 rpm에서는 시간의 흐름에 따라 diacetylstearoylglycerol의 수율은 감소했고, tristearin은 급속한 합성 속도의 증가를 보이며 생산되었다. 400rpm에서는 diacetylstearoylglycerol은 반응 4시간 뒤에도 여전히 높은 수율을 보였고, tristearin은 아직 많은 양을 생산되지 않았다. Diacetylstearoylglycerol과 distearoylacetylglycerol의 총 수율은 400rpm에서 반응 한 후 4시간에서 가장 높은 값을 보였다.

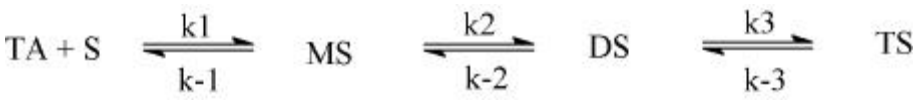


그림 11. The reaction scheme of lipase-catalyzed synthesis for accumulating salatrim

TA : Triacetin, S : stearic acid, MS : diacetylstearoylglycerol, DS : distearoylacetylglycerol, TS : Tristearin

200rpm에서는 400, 600 rpm에서보다도 diacetylstearoylglycerol과 di-stearoylacetylglycerol은 훨씬 적게 생산되었다. 200rpm에서 반응 5시간 후에서는 diacetylstearoylglycerol의 수율은 감소되었고, tristearin의 생산은 증가되었다. 따라서, 생산 수율 및 기계적 교반 경제성 관점으로 보아 400rpm의 교반속도가 salatrim의 생산에 최적 조건이다.

반응에 이용되는 효소의 양은 어떤 공정에도 경제적으로 중요하다. 전체 효소 반응에 사용한 기질의 1-8%(w/w)까지의 효소를 반응에 사용하여 살라트림 합성에 양상을 관찰하였다. 기질의 농도 1에서 4%(w/w)까지는 효소의 양이 증가할수록 생산 수율은 증가했고, 생산 수율은 기질 농도 8%(w/w)까지 감소했다. 따라서, 4%(w/w)의 기질 농도에서의 효소의 양이 최적으로 보이며, 이때 salatrim 수율은 75%이다.

다. 저 칼로리 유지(살라트림)의 구조 분석

위치 이성질체의 함량 변화를 조사하기 위해서, 시간에 따른 표본 채취를 열린 반응계(open reactor system)에서 수행하였다.

Mono-long 이성질체 (1,2-diacetyl-3-strearoglycerol and 1,3-diacetyl-2-streaoylglycerol) 와 di-long (1,3-distearoyl-2-acetylglycerol and 2,3-distrearoyl-1-aceylglycerol) 이성질체를 on-column injector가 장착된 GC로 분석하였다. 15mmol triacetin과 15mmol stearic acid가 사용되었고, 반응은 열린 반응계에서 70℃, 600rpm으로 3시간동안 이루어졌다. 표 9.는 열린 반응계에서 위치 이성질체의 함량 변화의 추이를 보여준다. 초기에는 AAS와 SAS의 함량이 각 mono-long과 di-long salatrim에서 ASA와 ASS보다 높았다. 시간이 경과할수록 isomerization에 의한 아실기(acyl group)의 이동이 일어

났고, ASA와 ASS의 함량이 증가되었다.

표 9. Positional isomer content change trend

Products Time(h)	AAS	ASA	Diacetylstearoyl glycerol	SAS	ASS	Distearoylacetyl glycerol	Salatrim
0.5	17.39	0.00	17.39	2.58	0.00	2.58	19.97
1.0	31.39	0.53	31.92	4.59	1.94	6.53	38.45
1.5	38.13	1.04	39.17	6.94	2.55	9.49	48.67
2.0	37.23	2.45	39.68	8.99	3.16	12.15	51.83
2.5	36.00	4.74	40.74	11.27	4.14	15.41	56.15
3.0	34.10	7.05	41.15	12.74	5.26	17.99	59.14
4.0	24.89	11.05	35.49	11.19	6.94	18.13	54.07
5.0	16.88	11.84	28.72	8.35	7.57	15.92	44.65

Molar ratio(1:1(15mmol), triacetin:stearic acid), 600 rpm, 70℃, novozyme 435:377g(5 wt% of substrate), reaction time : 3h
Yield = product mmol/triacetin mmol(%)

표 10.은 효소적으로 합성한 salatrim의 이성질체의 비 (AAS/ASA와 SAS/ASS)와 Nabisco Food group에서 화학적으로 합성한 salatrim의 이성질체의 비를 비교한 것이다. 표에서 보는 바와 같이 효소적으로 합성한 salatrim의 경우가 더 높은 이성질체 비를 나타내고 있다. 앞서 언급한 바와 같이 stearic acid가 글리세롤의 1, 3번 위치에서 에스터화 반응이 일어났을 때는 체내에서 바로 흡수되지 않지만, stearic acid가 글리세롤의 2번 위치에서 에스터화 반응이 일어났을 때는 앞의 경우와는 달리 즉시 흡수된다. 그래서 결론적으로 효소적으로 합성한 salatrim이 화학적으로 합성한 salatrim보다 더 효과적인 저 칼로리 구조 지질이라 말할 수 있다.

표 10. Comparison of the positional isomer content of a enzymatically synthesized salatrim and a chemically synthesized salatrim

	R1	R2
Enzymatically synthesized salatrim	4.70	2.42
Chemically synthesized salatrm	2.00	0.48

Isomer ratio : R1 = AAS/ASA
R2 = SAS/ASS
Enzymatically synthesized salatrim : Molar ratio(1:1(15mmol), triacetin:stearic acid), 600 rpm, 70℃, novozyme 435:377g(5 wt% of substrate), reaction time : 3h
Yield = product mmol/triacetin mmol(%)
Chemically synthesized salatrim : Nabisco Food Group(J.Agric.Food Chem.1994. 42:453-460)

라. Acetic acid(아세트산)에 대한 영향성

반응 시 생산되는 아세트산의 영향을 조사하기 위해, 반응기에서 아세트산의 제거 실험을 진행하였다. 아세트산은 aspirator에 의해 제거되었다. 진공 gage는 반응기 내의 vacuum pressure를 측정하는 데 이용되었다. 열린 반응계, 폐쇄 반응계, 10cmHg, 30cmHg로 아세트산을 제거하는 진공 반응계, 즉 4개의 다른 상황이 아세트산의 영향을 비교하기 위해 진행되었다. 다른 반응 조건은 동일하게 하여 효소 반응을 수행하였다. 표 11.이 아세트산의 제거 시 살라트림의 수율을 나타내는 데, 아세트산이 더 많이 제거될수록 더 많은 살

라트림이 생산되었다. 또 표 12.는 효소 반응이 종결된 후 반응물에 남아 있는 아세트산의 양을 분석한 것이다.

표 11. The experiment of a removal of acetic acid

	Diacetylstearoyl glycerol	Distearoylacetyl glycerol	Tristearin	Total Salatrim
1. Closed	28.61	6.56	2.38	35.17
2. Removal of acetic acid by vaccum				
a. 10cmHg	40.90	8.60	3.70	49.50
b. 30cmHg	43.50	9.11	3.46	52.61
3. Open	41.15	17.99	7.50	59.14

Molar ratio(1:1(15mmol), triacetin:stearic acid), 600 rpm, 70℃, novozyme 435:377g(5 wt% of substrate), reaction time : 3h
Yield = product mmol/triacetin mmol(%)

표 12. Quantification of acetic acid remaining in the reaction mixture

Reactor	Relative ratio	Relative amount
Open reactor	0.14	1
Closed reactor	2.07	14.79
Vacuum 10cmHg	0.97	6.92
Vacuum 30cmHg	0.90	6.43

Molar ratio(1:1(15mmol), triacetin:stearic acid), 600 rpm, 70℃, novozyme 435:377g(5 wt% of substrate), reaction time : 3h
Yield = product mmol/triacetin mmol(%)
Relative ratio = acetic acid/DMSO(0.1ml)
Relative acetic acid amount : Relative acetic and amount remaining in the reaction mixture

제 3 절 스케일-업을 통한 제품 생산

1. 서 론

효소를 이용한 저 칼로리 유지 생산의 산업화를 위해서는 지금까지 수행되어온 연구의 결과가 효소 반응의 스케일-업 시에도 그대로 반영되는지를 확인하여야 한다. 이는 실험실 수준에서의 효소 반응에서 영향을 주지 않던 인자들이 스케일-업 시에는 크게 영향을 끼치는 인자가 될 수도 있고, 반면에 낮은 수준의 반응에서는 크게 고려해야 하던 인자들이 스케일-업 시에는 별로 문제가 되지 않는 경우가 많기 때문이다. 예를 들어 반응 중 생성되는 acetic acid의 경우를 고려해보면 다음과 같다.

효소 반응이 진행됨에 따라 반응 부산물로써 acetic acid 가 생산이 된다. 지금까지의 연구 결과로 볼 때 salatrim 생산을 위한 효소 반응 system이 open system일 경우가 closed system일 경우보다 그 생산 수율이 높아 적당하다고 생각된다. 하지만 실험실 수준에서의 효소 반응에서는 acetic acid 생성량이 적기 때문에 별로 문제가 되지 않지만 이를 스케일-업 반응에 그대로 적용할 경우는 상대적으로 생성되는 acetic acid 양이 많아지기 때문에 상품 생산 환경에 좋은 않은 영향을 미치게 된다.

본 연구에서는 이렇게 저 칼로리 유지의 스케일-업 반응에서 일어날 수 있는 문제들과 효소 반응에 고려해야할 인자들을 결부시켜 연구하였다.

Salatrim 생산을 위한 효소 반응은 현재까지의 연구 결과를 종합해 볼 때 open system에서의 반응 수율이 closed system에서 보다 월등히 좋았다. 그 이유는 반응 중 부산물로써 생산되는 acetic acid가 반응에 좋지 않은 영향을 미치기 때문이라 생각된다. 즉, 생성된 acetic acid가 전체 반응 시스템의 pH

를 저하시켜 효소의 생화학적 구조와 활성에 영향을 미치거나 혹은 역반응을 초래할 수 있기 때문이다. Salatrim 생산을 위한 본 효소 반응에서는 기질로 사용되는 triacetin이 가수 분해되어 monoacetin과 diacetin으로 전환되고 이에 따라 acetic acid 가 생산된다. 이것이 반응 시스템 내에 축적되는 역반응이 일어나 triacetin으로 바뀔 수 있다. Open system에서는 이 acetic acid가 공기 중으로 자연 확산되어 제거되기 때문에 closed system에서 보다 그 반응 수율이 높다고 생각된다. 반응 시 생산되는 acetic acid의 영향을 조사하는 연구가 지난 해 연구 과제에서 이루어졌으나 이를 보다 정확히 알기 위해 보충 연구를 수행하였다.

2. 연구 결과

가. 진공 반응계에서의 효소 반응

Acetic acid가 효소 반응에 미치는 영향을 좀더 확실히 알기 위해 지난 실험에 이은 보충 실험으로 Closed system에서의 효소 반응계에 acetic acid를 첨가하여 반응을 진행시켰을 때의 양상을 살펴보았다. 25mmol, 50mmol, 75 mmol의 acetic acid를 각각 첨가하여 효소 반응을 36시간 동안 진행시켰으나 어떤 효소 반응계에서도 salatrim 생산은 전혀 일어나지 않았다. 이 때의 효소 반응 조건은 표 13. 과 같다.

표 13. The reaction conditions of closed system

Triacetin	50mmol
stearic acid	70mmol
효소(Novozym 435)	4% (w/w)
Stirring speed (RPM)	400
반응 온도	80℃
Acetic acid	25mmol, 50mmol, 75mmol

이 실험 결과로 미루어 보아 Salatrim 생산에 있어서 가장 중요한 인자 중 하나가 반응 시스템 내에 존재하는 acetic acid라고 생각된다. 그렇다면 이 acetic acid를 open system에서 보다 효과적으로 보다 효과적으로 제거할 수 있다면 생산 수율이 증가할 것이라 예상할 수 있다. 이를 위하여 vacuum system을 도입하였다. 이것은 그림 12.와 같이 효소 반응기를 진공 펌프와 연결하여 반응이 진행되는 동안 계속해서 반응기 내에 일정 수준의 vacuum pressure를 가하는 것이다. 약 70 cmHg의 vacuum pressure를 반응 시스템에 적용하였다. 이 반응 시스템을 open system, closed system과 비교하기 위해 36시간 동안 반응을 진행하였고 일정 시간 간격으로 표본을 채취, 분석하여 각 반응 시스템에서의 salatrim 생산 수율을 비교하였다. 그 결과는 그림 13., 그림 14와 같다.

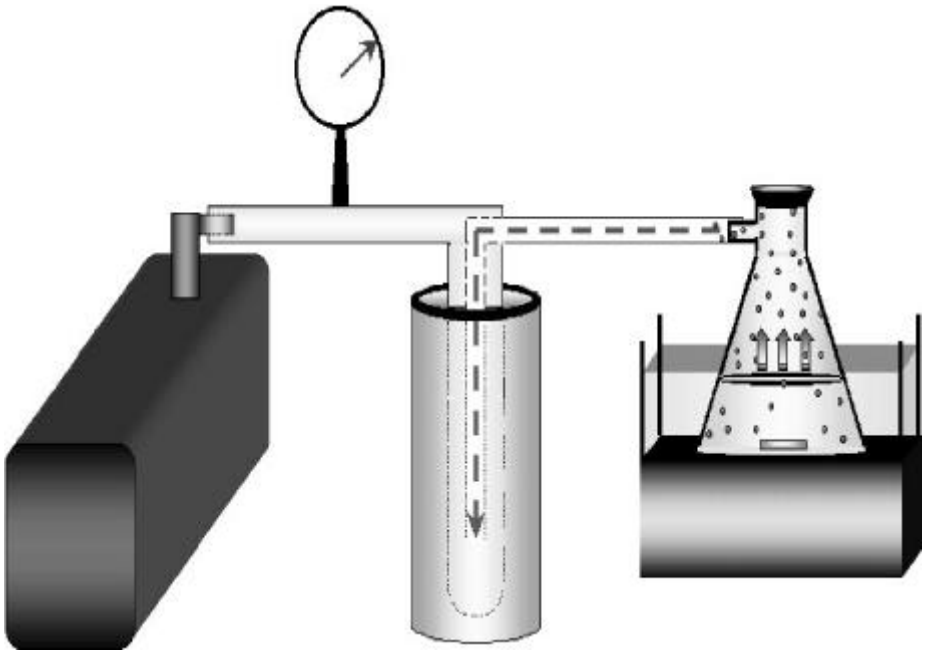


그림 12. Salatrim 의 효소적 생산을 위한 Vacuum system 공정도

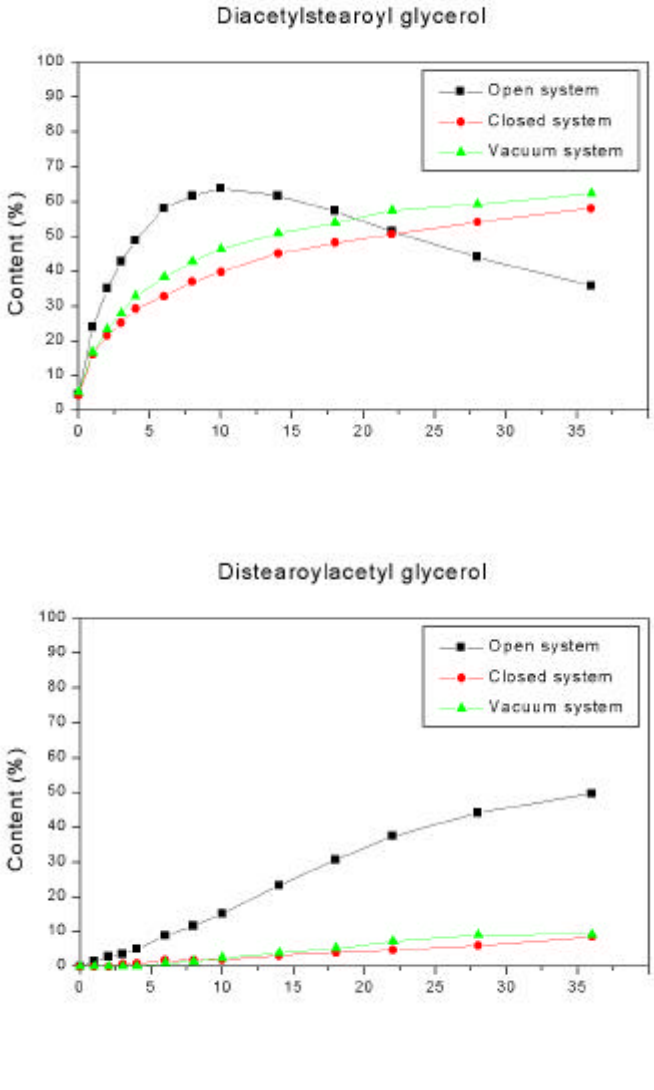


그림 13. Open, closed, vacuum reactor system의 diacetylstearoylglycerol 과 distearoylacetylglycerol 생산 수율 비교

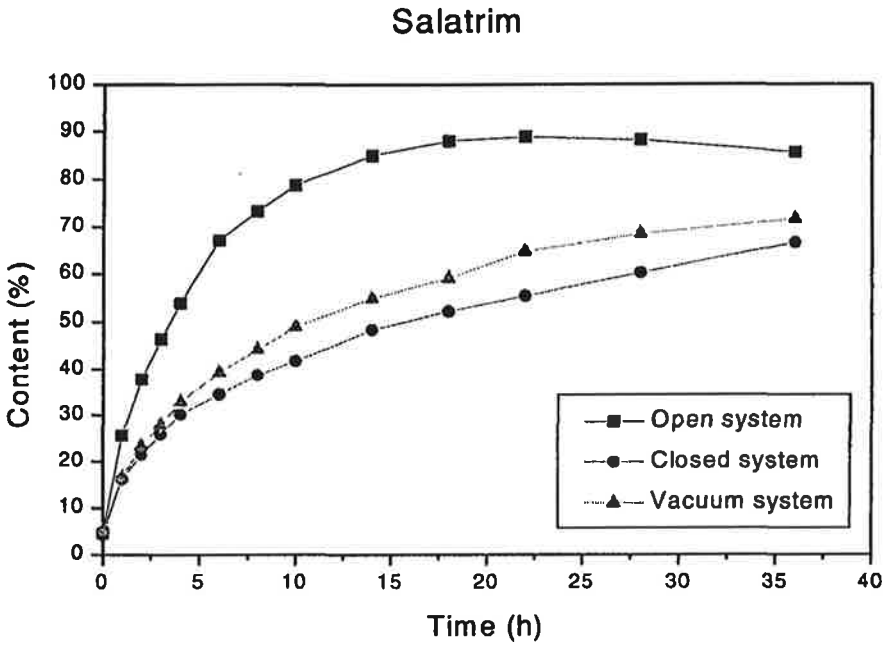


그림 14. Open, closed, vacuum reactor system의 salatrim 생산 수율

Vacuum system에서의 salatrim 생산은 closed system과 open system의 중간 정도 효율을 보이고 있다. 즉 acetic acid가 공기 중으로 자연 확산되어 제거되는 open system에서보다 효과적으로 acetic acid를 제거시키는 vacuum system에서 salatrim 생산 효율이 더 낮게 나타난다. 이것은 효소 반응 온도가 비교적 높은 온도에서 이루어지고, 또 vacuum system의 경우 효소 반응이 이루어지는 시간 동안 반응기 내에 높은 vacuum pressure가 부과되기 때문에 반응계에 존재하는 수분이 acetic acid와 함께 제거되기 때문이다. Acetic acid의 boiling point가 대략 118℃ 임을 감안하면 당연한 결과이다. 즉, acetic acid가 감압 하에서 증발되어 제거되면 수분 역시 제거되는 것이다.

나. 진공 반응계에서의 수분 첨가 효과

효소 반응을 이용한 salatrim 생산은 앞에서 설명한 효소 반응식에서처럼 기질로 사용되는 triacetin이 가수분해되어 mono-나 diacetin으로 전환되어 strearic acid가 결합되기 위한 자리를 제공하고 그 후에 re-esterification 반응이 일어나 salatrim이 생성되는 것인데, 이처럼 반응 시스템 내에 수분활성도가 매우 중요한 역할을 한다. 이것은 효소 반응기 내의 효소와 기질의 초기 수분활성도를 조절하여 salatirm 생산성을 살펴보았을 때 초기 수분활성도가 0.78 부근에서 가장 높은 수율을 보였던 실험 결과와도 일치하는 내용이다. 즉 vacuum system의 경우에는 triacetin이 가수분해되는데 필요한 수분이 acetic acid와 함께 모두 제거되기 때문에 생산 수율이 open system보다 낮게 나왔던 것으로 추측된다.

이를 개선하기 위해 vacuum system의 효소 반응에서 일정 시간 간격마다 효소가 필요로 하는 수분을 제공하는 실험을 수행하였다. 효소 반응이 진행되는

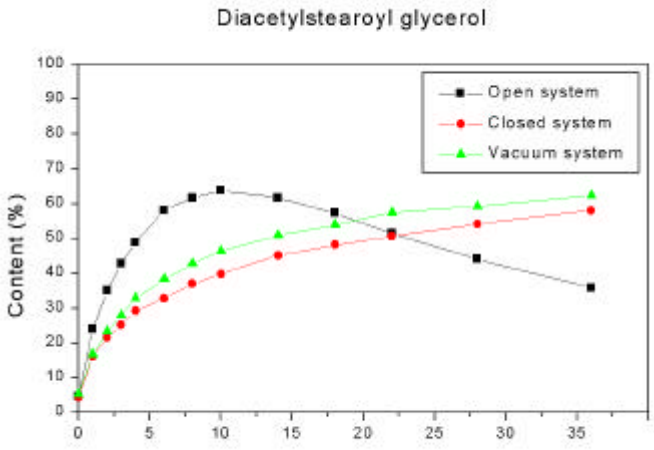
동안 1시간 간격으로 반응기내에 25㎕와 50㎕의 증류수를 각각 첨가하여 반응 수율을 분석하였다. 18시간 동안 vacuum system에서의 효소 반응을 open system, closed system과 비교한 것이 그림 15, 16이다.

그림에 나타난 바와 같이 vacuum system에서 효소 반응을 수행하면서 일정 시간 간격으로 수분을 첨가하는 경우가 가장 높은 salatrim 생산 수율을 나타냄을 알 수 있다. 즉 vacuum system에서 효소 반응의 수율 저하를 일으키는 acetic acid를 효과적으로 제거하고 이와 더불어 같이 제거되는 수분을 외부에서 직접 첨가해 보충 시켜줌으로써 높은 생산 수율을 얻을 수 있었다.

이는 salatrim 생산의 산업화에 있어서 큰 의미를 가지는데, 만약 비교적 실험이 간단하고 조작이 용이한 open system을 산업화에 적용할 때 생길 수 있는 문제점들을 생각해보면 다음과 같다.

실험실 수준에서의 효소 반응의 경우 기질과 효소 초기 수분활성도를 조절하여 반응에 사용할 수 있으나 scale-up 시에는 이것이 곤란해 질 수 있다. 많은 양의 효소와 기질을 항상 일정한 수분활성도를 갖도록 보관하기가 쉽지 않다는 뜻이다. 또 공기 중의 수분활성도를 의미하는 상대습도가 반응에 영향을 미치는 중요한 인자가 될 수 있다. 즉 반응 시의 공기가 건조할 때와 어느 정도 습한 조건에서의 반응 수율이 달라질 수 있기 때문이다.

효소 반응에 크게 영향을 미칠 수 있는 효소와 기질의 초기 수분활성도, 대기 중의 상대습도 등의 다양한 조합의 영향하에서도 높은 수율과 작은 분산을 갖는 즉, 재현성이 있는 공정 설계를 위해서는 closed system을 선택해야하며 이 때 생기는 반응 부산물(acetic acid)을 효율적으로 제거하기 위해서는 vacuum system의 도입이 불가피하다고 생각되고 반응 부산물의 제거와 함께 일어나는 반응기 내 수분 저하를 보충하는 공정도 고려해야 한다고 생각한다.



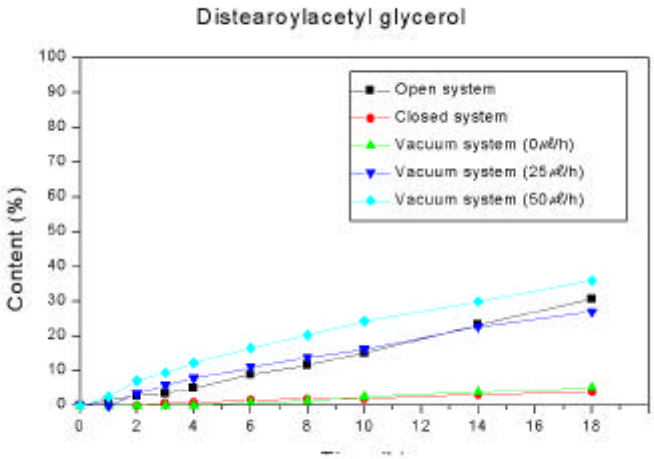


그림 15. Vacuum system에서의 수분 첨가가 diacetylstearoylglycerol과 distearoylacetylglycerol 생산 수율 미치는 영향

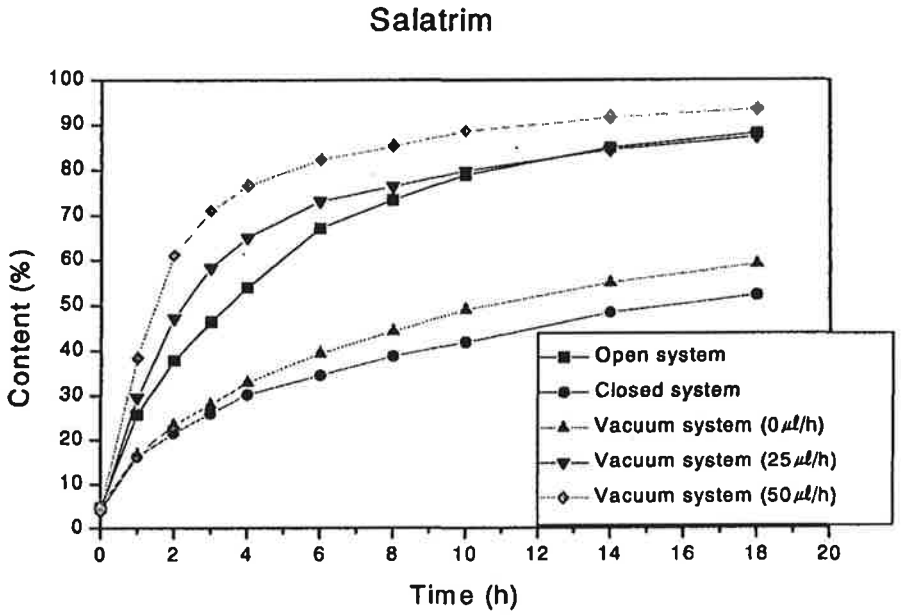


그림 16. Vacuum system에서의 수분 첨가가 salatrim 생산 수율 미치는 영향

본 진공 반응계에서의 효소 반응 연구는 현재까지 보고된 연구 결과를 바탕으로 스케일-업에 필요한 여러 가지 자료에 대한 연구 및 실험을 수행한 것이다. 즉 효소 반응에 영향을 미칠 수 있는 인자들 중에서 스케일-업 시에 크게 그 중요성이 부각되는 부분들을 중점으로 하여 연구를 진행하였다.

Salatrim 생산을 위한 효소 반응에는 반응 시 교반 속도, 반응 온도, 반응계의 수분활성도, 반응 부산물의 영향 등이 그 수율에 영향을 미칠 수 있는데, 이들 인자 중 스케일-업 시에 크게 비중을 차지하는 것은 반응부산물의 영향성과 반응계의 수분 활성도라 생각되어 진다. 이를 해결하여 재현성 있는 강력한 반응 공정을 설계하기 위해 vacuum system의 도입이 불가피하였다.

다. 진공 반응계에서의 적정 수분량 탐색

효소를 이용한 저 칼로리 유지 생산의 산업화를 위하여 지금까지 수행하여 온 실험실 스케일에서의 효소 반응을 스케일-업한 수준에서의 효소 반응이 필요하다. 지난 연구 수행 내용이었던 스케일-업에 필요한 자료 수집 및 기초 실험을 통하여 스케일-업 시에 발생할 수 있는 문제들과 효율적인 반응을 산업화에도 얻어 낼 수 있는 방법들에 관해 조사하였었다.

이번 연구에서는 저 칼로리 유지의 효소 반응을 통한 생산에서 가장 큰 문제가 되었던 반응 부산물-acetic acid-의 효율적 제거와 이에 따라 일어나는 반응 시스템 내의 적정 수분량(or 적정 수분활성도)의 조절에 관한 연구를 수행하였다. 또 이를 스케일-업 하였을 때 실험 시 나타났던 결과들이 재현될 수 있는지에 관한 연구와 문제 시 될 수 있는 인자들에 관해 고려해 보았다.

저 칼로리 유지 생산 시스템에 필요한 적정 수분량 유지에 관한 이론적 배경은 앞서 간략히 언급한 바와 같이, 효소 반응 시스템에 너무 적은 수분 환

경이 조성되면 기질, 즉 triacetin의 가수 분해에 필요한 수분량이 부족해지고 효소의 원활한 작용을 방해(즉, 효소의 flexibility를 저하)하는 환경을 이루므로 적합하지 않다. 또 너무 많은 수분량이 효소 반응 시스템에 조성될 경우는 역반응이 초래되어 생성된 salatrim이 오히려 가수 분해 되는 현상이 일어난다. 따라서, 적절한 수분 환경 하에서 최적의 salatrim생산 수율을 얻을 수 있다.

본 연구에서는 vacuum system에서 효소 반응이 진행되는 동안 일정 시간 간격으로 증류수를 반응 시스템에 첨가하여 효소 반응에 필요한 적정 수분량을 찾는 실험을 수행하였다. 다음 그림 17., 18.은 각 단계별 증류수를 효소 반응 시스템에 첨가하였을 때의 salatrim생산 profile을 나타낸 그림이다.

즉, 효소 반응 진행 동안 100㎕/hr 이하의 수분을 외부에서 공급하였을 경우 기질 가수 분해에 필요한 수분이 부족하고 또한 효소의 원활한 활동을 저해하는 환경이기 때문에 높은 수율을 얻을 수 없고 400㎕/hr 이상의 수분량은 salatrim 합성 반응의 역반응을 초래하기 쉬워 그 수율이 낮아진다. 효소 반응이 진행되는 동안 매 시간 100㎕ - 300㎕ 의 수분을 첨가해 준 경우 거의 비슷한 생산 양상을 나타내고 있다.

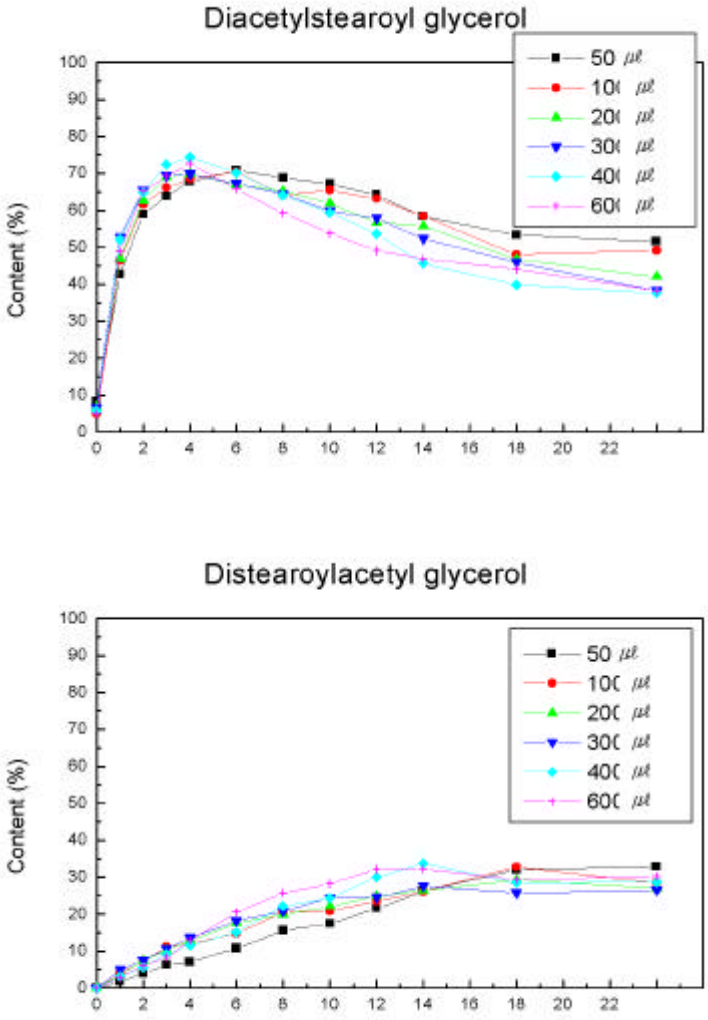


그림 17. Vacuum system에서 단계별 수분 첨가 시 mono-long, di-long SALATRIM 수율 비교

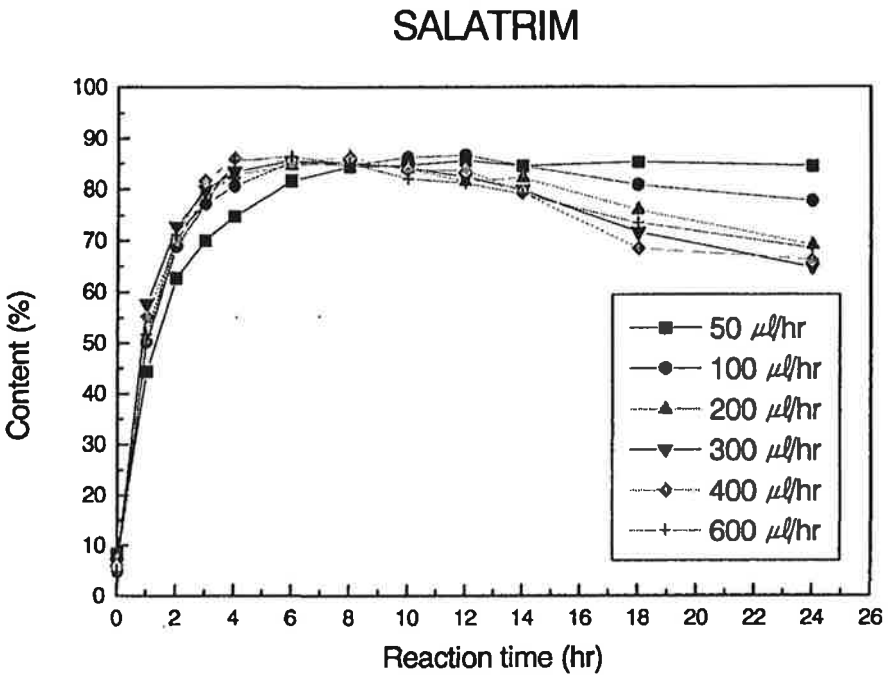


그림 18. Vacuum system에서 단계별 수분 첨가 시 총 SALATRIM 수율 비교

아래 표는 salatrim 생산을 위한 vacuum system에서의 효소 반응 조건을 나타낸다.

표 14. The reaction conditions of vacuum reaction system with addition of water

Substrate molar ratio (Triacetin:Stearic acid)	1 : 1.4
Triacetin	50 mmol
Stearic acid	70 mmol
Enzyme (Novozym 435)	4% of substrate (w/w)
Stirring Speed	400 rpm
Reaction temperature	80℃
Introduced Vacuum pressure	70 cmHg
Addition of water	50, 100, 200, 300, 400, 600μℓ/hr

Salatrim은 짧은 지방산과 긴 지방산이 글리세롤 구조에 같이 붙어 있는 유지를 의미하며 본 연구에서 모델 시스템으로 삼아 생산하는 salatrim역시 짧은 지방산(acetic acid)과 긴 지방산(stearic acid)이 글리세롤에 붙어 mono-long salatrim (diacetylstearoyl glycerol)과 di-long salatrim (distearoylacetyl glycerol)이 함께 생산된다. 이 두 가지 salatrim은 각각 존재하는 긴 지방산의 비율이 서로 다르기 때문에 그 물성 역시 다르다. 즉 유연성이 많이 필요로 하는 기존 지방 대체물로는 mono-long salatrim이 적당하겠고, 고상의 지방 대체물로써는 di-long salatrim이 적당하다고 생각한다.

본 모델 시스템에서는 효율적인 salatrim 생산을 위해 vacuum system에 외

부에서 필요한 수분을 첨가하는 방법을 도입하였는데, 우리가 어떤 목적의 salatrim을 생산하고자 하는가에 따라 첨가되는 수분량과 총 반응 시간이 달라질 수 있다. 즉, 서로 비슷한 salatrim 생산 수율을 보이는 반응 시스템이지만 효소 반응 시간과 첨가되는 수분량에 따라서 각 salatrim components (diacetylstearoyl glycerol and distearoylacetyl glycerol)의 생산량이 서로 다르게 존재한다.

라. 진공 반응계에서의 생산한 salatrim의 위치 이성질체 분석

체내에 긴 지방산이 흡수되는 것은 이것이 위치한 triacylglycerol의 위치와 음식 내에 칼슘이나 마그네슘이 함유되어 있는지의 여부에 의해 결정된다. 만약 긴 지방산(stearic acid)가 triacylglycerol의 2번 위치에 존재하게 되면 체내에 존재하는 리파제에 의해 2-monostearin으로 바뀌고 이는 쉽게 체내로 흡수되게 된다. 그러나 1이나 3위치에 긴 지방산이 존재하는 경우는 자유지방산 (free fatty acid)로 바뀌고 칼슘이나 마그네슘이 존재하는 상태에서도 잘 흡수되지 않는다. 따라서 triacylglycerol 분자에 긴 지방산이 존재하는 위치가 칼로리 측면에 있어 매우 중요하다.

본 저칼로리 생산을 위한 효소 반응에 의해서는 triacylglycerol의 1위치나 3위치에 주로 긴 지방산이 존재하게 되는데 이는 효소 반응에 사용되는 효소가 1,3 위치 특이적 효소이기 때문이다. 따라서 반응 초기의 생산물은 긴 지방산이 1이나 3위치에 존재하는 AAS나 SAS가 지배적이나 acyl기의 이동이 자연적으로 일어나 ASA나 ASS의 비율이 증가된다. 그림 3. 은 각 salatrim에 대한 isomeric ratio(AAS/ASA or SAS/ASS)를 나타내고 있다. 즉 이 isomeric ratio가 높을수록 칼로리 측면에서 유리하다.(그림 19.)

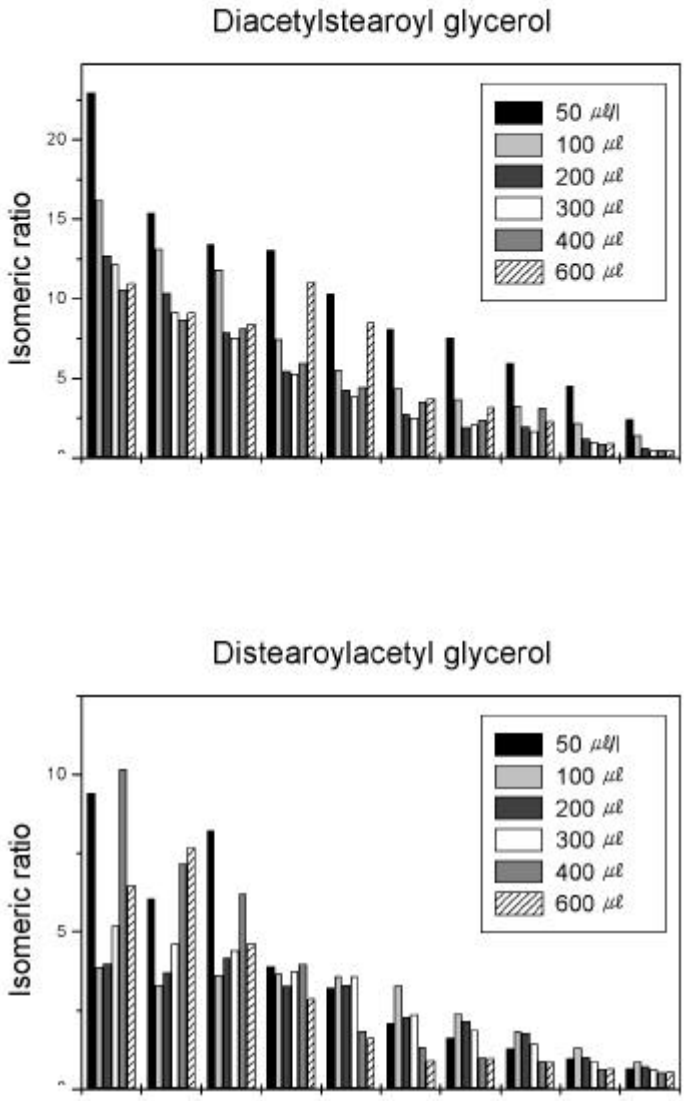


그림 19. Vacuum system에서 단계별 수분 첨가 시 mono-long, di-long SALATRIM isomeric ratio 비교

스케일 업 시에는 작은 수준의 실험에서 일어나지 않던 혹은 작은 영향을 미치던 인자들이 크게 영향을 줄 수 있는데, (예를 들어 교반 속도나 반응 온도의 불균일화 등) 이런 문제점들에 대해서 둔감하고 외부의 미세한 변화에 민감하지 않는 시스템 개발이 매우 중요하다. 이를 위해서는 반응 시스템에 영향을 주는 조절 가능한 인자들을 적절히 조정하여 강력한 반응 시스템을 개발할 수 있는데, 이것이 "Taguchi's optimization method"의 기본 원리이기도 하다.

Salatrim의 효율적인 스케일 업 생산에 필요한 인자들을 점검하였다. 이 효소 반응에서는 보다 효율적인 반응 부산물 (acetic acid)의 제거와 적정 수분량(수분 활성도)을 효소 반응 시 유지하는 것이 가장 중요한 인자가 될 수 있다. 또 이 인자들의 조절에 의해 외부 변화에 둔감하면서 높은 수율을 얻을 수 있는 조건을 연구하였다.

마. 진공 반응계에서의 효소양에 따른 salatrim 생산의 변화

지금까지 수행한 salatrim 생산을 위한 반응 시스템을 비교해 보면, 외부에서 효소 반응에 필요한 수분을 첨가하는 진공 반응계가 가장 우수함을 알 수 있었다. 효소를 이용하여 합성한 salatrim의 산업화를 위한 가장 큰 문제는 효소의 가격이라 생각된다. 즉 최소한의 효소를 이용하여 효율적인 생산 수율을 얻기 위해서는 첫째로 반응 수율이 높아야하고, 둘째로 효소의 재사용이 가능해야 한다. 본 실험에 사용되는 Novozym 435는 80℃의 반응 온도에서도 오랜 시간 견디는 우수한 열안정성을 보이고 있다. 이것은 효소 반응 수율이 초기에 maximum에 도달한다는 가정 하에 효소의 재사용 가능성을 보여주는 것이다.

다음 그림 20.은 사용되는 기질의 무게의 1%, 2%, 4% 의 효소를 사용하여 진공 반응계에서 salatrim 생산 수율을 관찰한 것이다. 이 때 외부에서 첨가한 수분의 양은 200㎕/hr이며 70 ㎝Hg 진공압이 도입되었다.

그림에서 볼 수 있는 것처럼 효소의 양이 줄어들수록 최대 반응 수율에 도달하는 시간은 길어진다.

산업화를 위해서는 효소의 재사용을 위해 반응물에서 효소를 회수하는데 드는 비용과 최소량의 효소를 사용하여 재사용하지 않고 효소 반응 시간을 길게 할 때 추가되는 비용을 비교하여야 할 것이다.

바. 진공 반응계에서 효소 변화에 따른 salatrim 생산의 변화

지금까지 salatrim의 효소적 생산을 위해 사용하였던 효소는 Novo Nordisk 사에서 시판되던 *Candida antarctica* 유래의 고정화 효소인 Novozym 435였다. 그러나 현재는 이 효소는 Novo 사에서 더 이상 생산 및 판매하지 않고 대신 Boehringer Mannheim(Roche Diagnostic의 옛 이름)에서 Chirazyme L-2 c.-f. C2, Lyo (cat.no. 1859242)란 이름으로 생산 및 판매되고 있다. Roche Diagnostic사에 의하면 효소 활성이나 기능상의 변화는 없지만 고정화 시 사용되는 support의 변화가 있다고 한다.

새로이 바뀐 이 효소의 salatrim 생산 양상을 확인하기 위해 이 효소를 구입하였고, 실제 진공 반응계에서 실험하였다. 각 단계별로 증류수를 첨가하였으며 이 때의 생산물 생산 양산은 그림 21., 22와 같다.

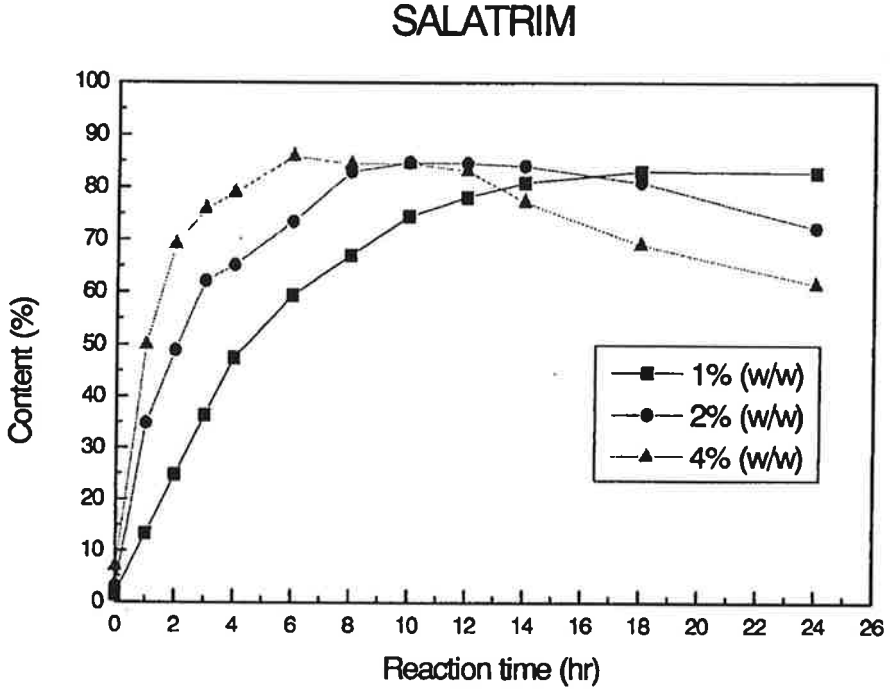


그림 20. Vacuum system에서 단계별 수분 첨가 시 효소양이 반응에 미치는 영향

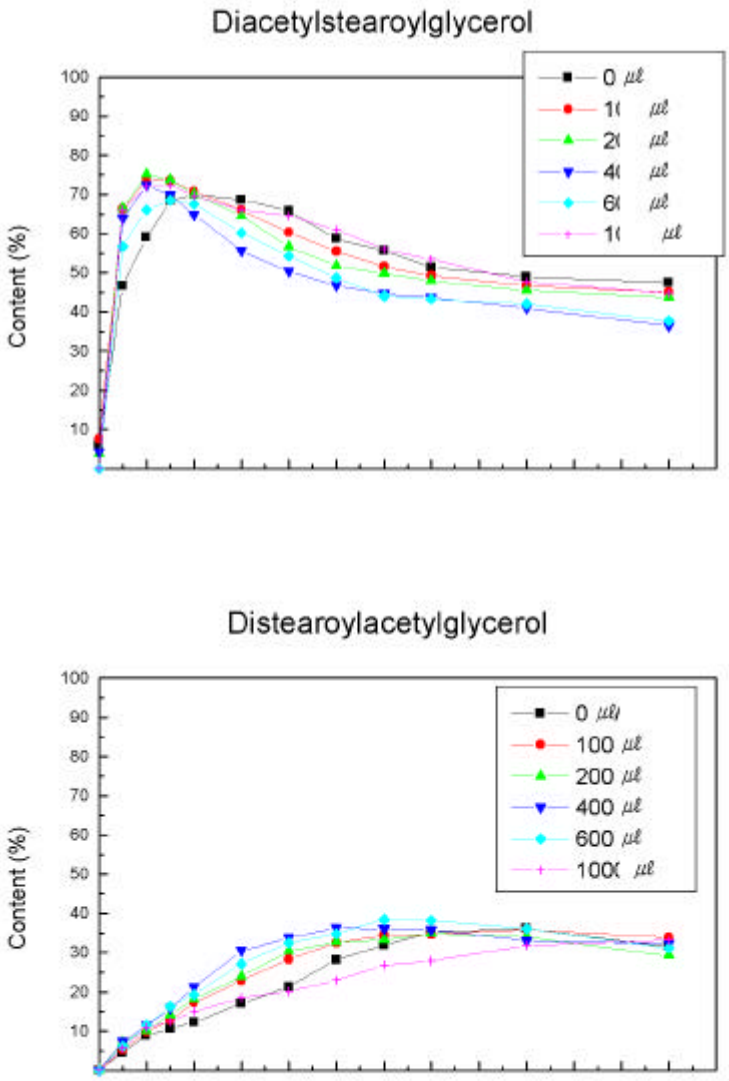


그림 21. Vacuum system에서 단계별 수분 첨가 시 mono-long, di-long SALATRIM 수율 비교 (Chirazyme L-2)

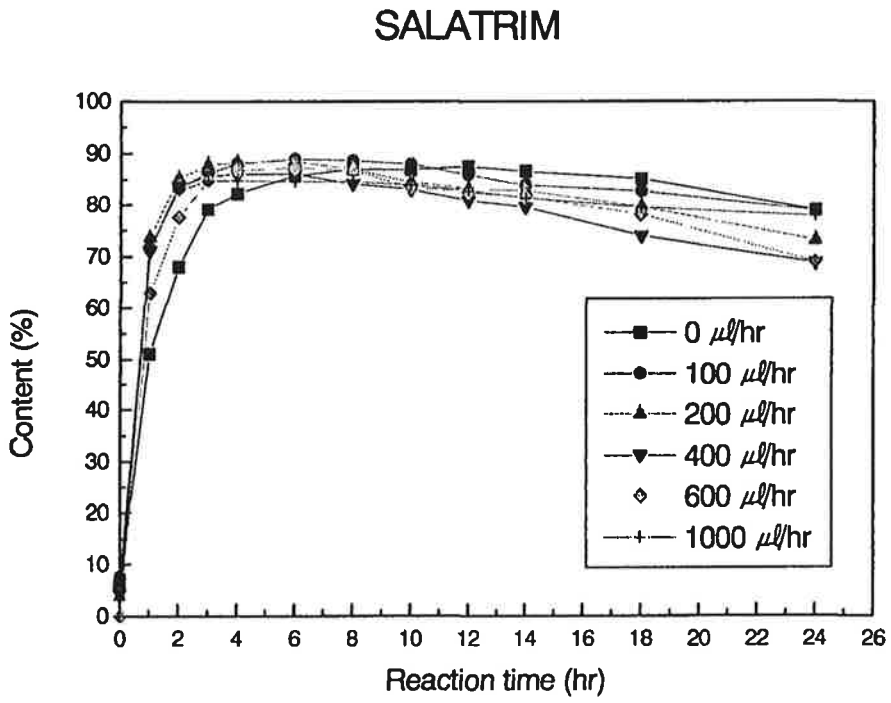


그림 22. Vacuum system에서 단계별 수분 첨가 시 SALATRIM 수율 비교 (Chirazyme L-2)

Salatrim 생산 측면에 있어서 새로이 바뀐 Chirazyme L-2는 기존의 Novozym 435보다 최대 반응 수율에 도달하는 시간을 대략 1시간 정도 앞 당겼다. 즉, Novozym 435의 경우 최적 반응 조건에서 반응 시작 후 4-5 시간 경과 후에 최대 반응 수율을 보이는 반면 Chirazyme L-2는 약 2-3시간 후에는 최대 반응 수율을 기록하였다. 아마도 기존의 사용에 고정화 support가 바뀌면서 효소의 transesterfication 활성이 높아진 것으로 추측된다.

사. 진공 반응계에서 스케일-업 salatrim 생산

진공 반응계에서의 효소 반응 최적화 조건과 기존의 효소 보다 증가된 활성을 가지는 Chirazyme L-2을 이용하여 스케일-업 된 수준에서 salatrim 생산을 시도하였다. 12배 스케일-업한 기질과 효소 그리고 첨가하는 수분량을 1L 반응기에 넣고 효소 반응을 수행하였으면 이 때의 효소 반응 조건은 표 15.와 같다.

효소 반응 결과 그 생산 수율 양상은 실험 조건의 최적화를 위해 실험하던 수준에서와 비슷한 양상을 보였으며 최대 수율과 최대 수율에 도달하는 시간 역시 비슷하였다. 즉 12배 스케일-업된 효소 반응의 결과는 재현성 있게 나타났다.(그림 23.)

최적 조건의 진공압은 70 cmHg을 도입한 것이었지만, 경제성을 생각하여 더 낮은 진공압을 도입하였을 때의 효소 반응 양상을 확인하였다. 30 cmHg과 50 cmHg의 진공압 하에서 효소 반응을 진행한 결과 반응 시작 후 3-4 시간 후부터는 거의 반응이 진행되지 않았다. 최대 수율은 대략 4시간 후에 나타났으며 이때의 수율은 85% 정도였다. 생성된 acetic acid를 효율적으로 제거하기 위해서는 70 cmHg 이상의 진공압이 필요한 것으로 생각된다.

표 15. The reaction conditions of vacuum reaction system with scale-up condition

Substrate molar ratio (Triacetin:Stearic acid)	1 : 1.4
Triacetin	600 mmol
Stearic acid	840 mmol
Enzyme (Chirazyme L-2)	4% of substrate (w/w) : 14.8g
Stirring Speed	400 rpm
Reaction temperature	80℃
Introduced Vacuum pressure	70 cmHg
Addition of water	2400 μℓ/hr

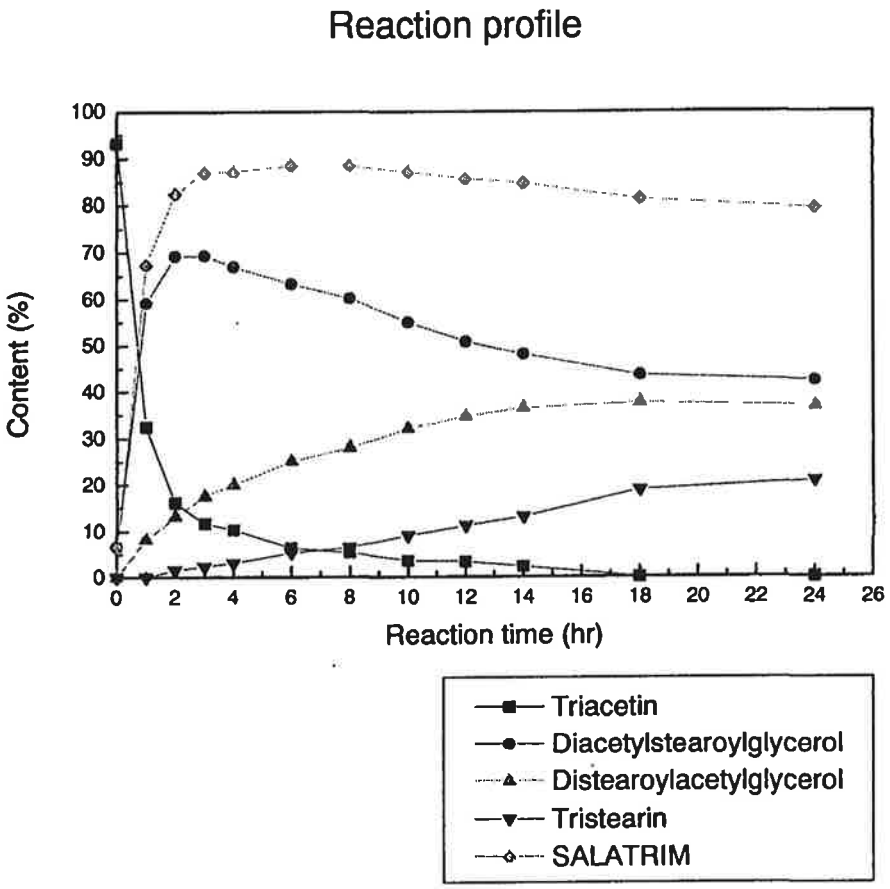


그림 23. 스케일-업(12배) 수준에서의 효소 반응 profile

제 3 장 결 론

유용한 고부가가치 식품 생물 공학 제품의 실용화를 위해서는 자연적인 천연 물질의 탐색, 기존의 물질을 구조와 활성이 다른 물질로의 전환, 새로운 물질의 창조 등을 통한 방법이 있다.

본 연구는 “효소를 이용한 저 칼로리 유지 생산” 에 대한 연구로서 기존에 화학적인 방법으로 생산되고 있는 저 칼로리 유지를 효소를 이용해 생산하고자 한 것이다. 사람들의 생활 수준이 높아질수록 건강에 대한 관심은 커진다. “저 칼로리”라는 단어 역시 생활 수준의 향상과 더불어 관심의 대상이 된 단어라 생각된다. 기존의 생산되고 있는 화학적 방법으로 만들어진 salatrim이나 caprenin에 대한 효소적 합성 노력은 결국 화학적으로 만들고 있는 제품에 대한 가격 측면의 경쟁력이 있어야 그 빛을 발할 것으로 기대된다. 효소적 저 칼로리 유지 생산에서 가장 cost가 많이 드는 것은 역시 효소 가격이다. 따라서 최소한의 효소를 사용하여 최대의 생산 수율을 얻어야 한다.

이를 위하여 저 칼로리 유지를 생산하는 최적 효소 반응 시스템을 탐색하였고, 각 반응 시스템에서의 문제점을 발견할 수 있었다. 본 연구에 사용된 반응 시스템은 유기 용매의 독성을 고려하여 solvent-free system을 기초로 하여 선정하였다.

폐쇄 반응계(Closed reactor system)의 경우, 기질과 반응 중 일어나는 모든 상황을 생산자가 control할 수 있다는 장점이 있으나 반응 부산물로 생성된 acetic acid의 pH 저하 효과와 역반응의 진행 때문에 높은 수율을 기대하기 어렵다.

열린 반응계(Open reactor system)의 경우, 부산물로 생성된 acetic acid가 대기 중으로 확산되어 제거되고 또, 대기 중의 수분과 반응물 중의 수준이 서

로 교환될 수 있기 때문에 효소가 필요로 하는 최소 수분량의 유지가 용이하다. 하지만 반응 시스템과 외부가 서로 격리 되어있지 않기 때문에 외부 환경의 변화에 따라 생산 수율 역시 변동이 생길 수 있다. 예를 들어 장마철과 같이 습기가 많은 환경에서의 반응과 겨울과 같이 건조한 환경에서의 반응 수율이 각각 다르게 나올 수 있다.

진공 반응계(Vacuum reactor system)의 경우 효소 반응을 저해하는 acetic acid를 효율적으로 제거시키는 장점이 있으나 이와 동시에 효소가 필요로 하는 수분도 같이 제거 된다는 단점이 있다. 이를 보완하기 위해 와부에서 일정 시간 간격으로 수분을 첨가해 주었으며 앞에 설명한 2가지 system에 비해 더 높은 반응 수율과 더 빠른 반응 속도를 보였다. 효소 반응계에 첨가되는 수분량을 최적화하여 85%이상의 수율을 얻을 수 있었고 12배 스케일-업 한 효소 반응 시스템에서도 같은 수율과 반응 속도를 얻을 수 있었다.

효소를 이용하여 생산한 저 칼로리 유지의 산업화의 관건은 효소 가격인데, 현재 Roche Diagnostic사에서 판매하고 있는 Chirazyme L-2 c.-f. C2, Lyo (cat.no. 1859242)의 가격은 DM 480.00/MU 즉, 대략 1,560,000 won/kg 정도이다. 기존에 상품화 되어 있는 화학적으로 생산한 salatrim에 대해 경쟁력을 갖기 위해서는 최소 3번의 효소 재사용이 필요하고 1회 효소 사용양도 전체 반응 기질의 0.1%를 넘어서는 안되다고 판단된다.

현재로서는 효소를 이용한 저 칼로리 유지의 생산 산업화가 어렵겠지만 효소의 가격이 떨어지는 가까운 미래나, 국내에서 특허를 가지고 있는 신규 리파제의 저렴한 공급이 있다면 멀지 않은 장래에 산업화가 가능하리라 생각된다.

제 4 장 참 고 문 헌

1. Smith, R. E., J. W. Finley, and G. A.Leveille, Overview of SALATRIM, a Family of Low-Calorie Fats, *J Agric. Food Chem. 42*:432-434 (1994)

2. Kosmark, R., SALATRIM: Properties and Applications, *Food Technology 4*:98-101 (1996)

3. Akoh, C.C., Structured Lipids-Enzymatic Approach, *INFORM* 6:1055-1061 (1995)

4. Mattso, F. H., and G.A. Nolen, The Absorbability by Rats of Various Triglycerides of Stearic and Cleic acid and the Effect of Dietary Calcium and Magnesium, *J. Nutrition 109*:1682-1687 (1979)

5. Finley, J. W., L. P. Klemman, G. A. Leveille, M. S. Otterburn, and C. G. Walchak, Caloric Availability of Salatrim in Rats and Humans, *J Agric. Food Chem.* 42:495-499 (1994)

6. Hayes, J. R., J. N. Finely, and G. A. Leveille, In Vivo Metabolism of SALATRIM Fats in the Rat, *J. Agric. Food Chem.* 42:500-51 (1994)

7. Jandacek, R. J., J. A. Whiteside, and B. N. Holcombe, The Rapid Hydrolysis and Efficient Absorption of Triglycerides with Cctanoic Acid in the 1- and 3- Positions and Long Chain Fatty Acid in the 2-Position, *Am. J. Clin. Nutr. 45*: 940-945 (1987)

8. Klemann, L. P., K. Aji, M. Chrysam, R. P. D'Amelia, J. M. Henderson, A. S. Huang, M. S. Otterburn, G. Boldt, and A. Roden, Random

Nature of Triglycerols Produced by The Catalyzed Interesterifiaction of Short-and Long Chain Fatty Acid Triglycerides, *J. Agric. Food Chem.* *42*:442-446 (1994)

9. Huang, A. S., G. M. Dleano, A. Pidel, L. E. Janes, B. J. Softly, and G. J. Templeman, Characterization of Triacylglycerols in Saturated Lipid Mixtures with Application to SALATRIM 23CA, *J. Agric. Food Chem.* *42*:453-460 (1994)

10. Haumann, B. F., Structured Lipids Allow Fat Tailoring, *INFCRM* 8:1004-1011 (1997)

11. McNeil, G. P., and P. E. Sonnet, Low-calorie Triglyceride Synthesis by Lipase-coach, INFCEsterification of Monoglyceride, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 72:1301-1307 (1995)

12. Babayan, V. K., Specialty Lipids and Their Biofunctionality, *Lipids* 22:417-420 (1987)

13. Myrnes, B., H. Barstad, R. L. Olsen, and E. O. Elvevell, Solvent-free Enzymatic Glycerolysis of Marine Oils. *J. Am. Cil Chem. Soc.* 72:1339-1344 (1995)

14. Huang, K. H., and C. C. Akoh, Enzymatic Synthesis of Structured Lipid, *J. Am. Cil Chem. Soc.* 73:245-250 (1996)

15. Lee, K., and C.C Akoh, Immbilized Lipase-catalyzed Production of Structured Lipids with Eicosapentaenoic Acid at Specific Positions, JACCS 73:611-615 (1996)

16. Soumanou, M.M., U.T. Bornscheuer, U. Menge, and R.D. Schmid, Synthesis of Structured Triglycerides from Peanut Cil with Immobilized

Lipase, JACCS 74:427-433 (1997)

17. Henderson, J. M., M. Petershein, G. J. Templeman, and B. J. Softly, Quantification and Structure Elucidation of the Positional Isomers in a Triglyceride Mixture Using Proton and Carbon One-and Two-Dimensional NMR, *J. Agric. Food Chem. 42*:435-441 (1994)

18. Zaks, A., and A. Klibanov, The effect of water on enzyme action in organic media, *J Eiol. Chem. 263*: 8017-8021 (1988)

최 종 보 고 서

1999년도 농림기술개발사업에 의하여 완료한 효소를_이용한_저_칼로리_유지의_생산에 관한 연구의 최종보고서를 별첨과 같이 제출합니다.

첨부 : 1. 최종보고서 10부

2. 최종보고서 디스켓 1매

1999 . 10 . 30 .

주관연구기관 :한국과학기술원

총괄연구책임자 : 이 준 식 (인)

주관연구기관장 : 한국과학기술원장

농 림 부 장 관 귀 하

직 인