

역마이셀-효소반응계에 의한 코코아 버터 대용지 개발에 관한 연구

윤승헌 · 신웅규 · 이윤형 · 이규순

해태제과 주식회사

Studies on the Development of Cocoa Butter Equivalent Fat by Reverse-Micelle Enzyme Reaction System

Seung-Heon Yoon, Woong-Kyu Shin, Yoon-Hyung Lee and Kyu-Soon Rhee

Haitai Confectionery Co.

Abstract

Production of cocoa butter equivalent fat (CBE) from palm oil and stearic acid by reverse micelle-lipase reaction system was studied. Qualitative and quantitative analyses of triglycerides were performed by HPLC. The reaction conditions for maximum conversion from triolein and stearic acid to 1-stearoyl-2,3-dioleoyl glycerol(SOO) and 1,3-distearoyl-2-oleoyl glycerol(SOS) were as follows: a molar ratio of water/Aerosol OT, 10; triolein, 30 mM; stearic acid, 90 mM; pH, 7.5; and temperature, 50°C. By lipase in reverse micellar system containing palm oil and stearic acid, 1,3-dipalmitoyl-2-oleoyl glycerol(POP), 1-palmitoyl-2,3-dioleoyl glycerol(POO) and SOO decreased, but large amounts of 1-palmitoyl-2-oleoyl-3-stearoyl glycerol(POS) and SOS was formed.

Key words: cocoa butter equivalent fat, lipase, palm oil, reverse micelles

서 론

코코아 버터는 코코아 콩(*Theobroma cacao*)의 자연 지방성분으로, 미국 식품 의약국에서는 “잘 성숙된 코코아 콩으로부터 배초(roasting)전 혹은 후에 얻어지는 식이지방”으로 정의하고 있다⁽¹⁾.

코코아 버터는 초콜릿 제조 뿐만 아니라 아이스크림, 제과공업 등에 이용되는데, 기계적 압착으로 얻어진 코코아 버터는 연노랑색의 지질로 20°C 이하에서는 딱딱한 물성을 보이고 30~20°C에서 녹기 시작하여 35°C 이상에서는 급격히 용해되는 특성을 보여 입속에서 코코아 버터가 녹을 때 시원한 감을 느끼게 한다^(1,2).

1940년대 후반 이후 코코아 가격의 상승과 코코아 작물의 수급 불균형시 발생하는 가격과동을 경험하면서 초콜릿 산업체 등에서 코코아 작물의 작황에 관계없이 사용할 수 있는 유지, 즉 코코아 버터에 대체할 수 있는 유지(cocoa butter replacement fat : CBR) 개발에 관심을 갖게 되었다.

CBR에는 크게 나누어 cocoa butter substitute(CBS)와 cocoa butter equivalent fat(CBE)가 있는데⁽¹⁾, 전자는 코코넛, 팜, 팜핵유 등에서 분별, 경화과정 등을 거쳐 저급지방산들이 많이 포함된 지방을 말하는데 그 화학적

조성은 코코아 버터와 전혀 다르다. 반면 코코아 버터 대용지(CBE)는 코코아 버터와 물리적, 화학적 성질은 거의 유사하지만 코코아 콩 이외의 것에서 얻어진 것을 말한다. 이들은 제품의 일부(고급 초콜레품) 또는 전부(코팅 제품 등)에 이용될 수 있다.

코코아 대용지 제조방법에는 팜, 일리케, 샤프트유 등에서 분별된 유지들을 조합하여 얻는 방법, 화학 촉매 하의 무차별적 에스테르교환 방법⁽³⁾과 중용점 팜유와 스테아르산으로부터 리파제(EC 3.1.1.3) 촉매하에서 에스테르교환 반응을 시켜 얻는 방법 등이 있다.

효소적 에스테르교환 반응계에는 이상계⁽⁴⁾, 수분이 거의 없는 유기용매계⁽⁵⁻¹⁰⁾, 계면활성제를 이용한 마이 크로에멀전 방법^(11,12), 초임계 이산화탄소내에서 효소반응을 유도한 방법⁽¹³⁾, 소수성막을 이용한 방법⁽¹⁴⁾ 등이 있다. 이 반응계들에 사용되는 효소는 별다른 처리를 하지 않은 경우^(4,11,12,14), 고정화 효소를 사용하는 경우^(5,9,10,13), 화학적으로 수식된 효소를 사용하는 경우⁽⁶⁻⁸⁾ 등으로 대별할 수 있는데, 효소적 에스테르교환 반응에 의한 코코아 버터 대용지 제조방법은 고정화 효소를 이용한 방법이 주로 이용되고 있다^(3,5,6,15-17).

이와는 다른 방법으로, 특히 유지를 기질로 하는 경우에는 유지의 용해도가 높은 유기용매내에서 AOT 등의 계면활성제에 의한 역마이셀-리파제 반응계를 이용하여 원하는 형태의 반응을 유도하는 경우가 많다. 다만 AOT-유기용매 역마이셀계내에서의 리파제반응은 주로 가수 분해에 관한 것이 대부분이다⁽¹⁸⁻²¹⁾.

Corresponding author: Seung-Heon Yoon, 2nd Lab., Haitai Confectionery Co., 86-5-ka, Yangpyung-dong, Youngdeungpo-gu, Seoul 150-151, Korea

Table 1. Operating conditions of HPLC for triglyceride analysis

HPLC	Waters Associates Model 490E
Column	u-Bondapak C18, 3.9 mm × 30 cm
Mobile phase	Acetonitrile: 2-Propanol = 240 : 130
Flow rate	1.2 ml/min
Detector	UV 214 nm
Column temperature	31°C

본 연구에서는 AOT에 의한 핵산내의 역마이셀-리파제 반응계에서 에스테르교환 반응에 영향을 미치는 인자들을 살펴보고, 이 반응계에서 코코아 버터와 물리적, 화학적 성질이 유사한 유지제품을 값싼 팜유와 스테아르산으로부터 생산하는 방법에 대하여 연구하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용된 효소인 리파제(EC 3.1.1.3)는 *Rhizopus arrhizus*에서 분리된 것으로 Sigma사 제품(Type XI ; 191 전환 역가/ml 효소액)을 더이상 정제하지 않고 사용하였다. 계면활성제인 AOT(Sodium bis(2-ethylhexyl)-sulfosuccinate)는 Sigma사 제품을 메탄올과 활성탄으로 정제⁽²²⁾하여 사용하였다. 트리올레인과 스테아르산은 99% 이상의 순도를 지닌 것으로 Sigma사 제품을 사용하였다. 트리글리세리드 표준품은 99% 이상의 것으로 Sigma사 제품을 사용하였다. 팜유는 서울하인즈 제품, 코코아 버터는 de Zaan(Singapore) 제품 및 Bendrop(Holland) 제품, CBE(coberine)는 Croklaan(Holland) 제품을 사용하였다. 기기분석은 Waters Associates Model 490E의 HPLC를 이용하였다. 핵산 등 기타 유용용매는 HPLC용, 시약은 일급 이상을 사용하였다.

HPLC에 의한 트리글리세리드 분석

최 등의 방법⁽²³⁾을 변형하여 트리글리세리드 정성분석을 행하였다. 분석조건은 Table 1과 같고, 이 조건에서 각 트리글리세리드 표준품의 용출시간을 측정한 결과는 Table 2와 같다. Table 1, 2의 조건에서 표준곡선을 작성하여 상업유지(5 mg/ml) 및 반응물의 트리글리세리드 정성, 정량분석을 행하였다.

효소-역마이셀 제조

핵산에 AOT를 녹인(55 mM) 용액에, 각 완충액에 녹인 효소액을 일정량 첨가하고 20초 동안 강하게 혼합하여 제조하였다. R value(moles of water/moles of AOT)는 일정량의 효소용액과 완충액으로 조정하였다⁽¹⁸⁾.

에스테르교환 역가측정

트리올레인(30 mM)과 스테아르산(90 mM)이 녹아있는 효소-역마이셀 용액을 37°C 항온조에서 진탕하면서

Table 2. Retention time of various triglycerides by HPLC

Trglyceride	Retention time(min)
Triolein(OOO)	17.63
1-palmitoyl-2,3-dioleoyl glycerol(POD)	18.19
1,3-dipalmitoyl-2-oleoyl glycerol(POP)	18.82
1-stearoyl-2,3-dioleoyl glycerol(SOO)	22.15
1-palmitoyl-2-oleoyl-3-stearoyl glycerol(POS)	22.94
1,3-distearoyl-2-oleoyl glycerol(SOS)	27.96
Tristearin(SSS)	33.01

반응시키고 일정시간 후 트리올레인 및 스테아르산이 전이되어 생성된 트리글리세리드(1-stearoyl-2,3-dioleoyl glycerol, SOO ; 1,3-distearoyl-2-oleoyl glycerol, SOS)를 HPLC로 정성, 정량분석하여 측정하였다. 효소역가 1단 위는 1시간 동안 트리올레인에 스테아르산 1 μmole을 전이하는 효소의 양으로 하였다. 효소원액은 191.4 unit/ml 효소액이었고, 필요에 따라 완충용액으로 희석하여 사용하였다.

에스테르 교환조건에 따른 전환율의 변화

AOT-핵산 용액(55 mM)에 대하여 R value를 2.5~20 사이로 조정되게 일정량의 효소액을 첨가한 다음 37°C에서 24시간 반응 후 전환율(conversion ratio ; (반응 후 SOO mmole 수+SOS mmole 수)/초기 트리올레인 mmole 수×100)을 측정하였다. 기질인 트리올레인과 스테아르산에 대하여 첨가하는 트리올레인 농도를 10 mM에서 40 mM까지 증가시키고, 동시에 첨가하는 트리올레인에 대한 스테아르산의 농도비를 0.5~5로 조정하여 반응시킨 후 전환율을 측정하였다. 트리올레인(30 mM), 스테아르산(150 mM)이 포함된 55 mM AOT-핵산 용액에, 각 pH별(pH 5~9)로 조정된 완충용액에 녹인 효소액을 첨가하여 전환율을 측정하였는데, pH 5~6에서는 0.02 M 초산완충액, pH 6~8에서는 0.05 M 인산완충액, pH 8~9에서는 0.02 M 트리스-염산완충액을 사용하였다. 온도변화에 따른 에스테르교환에 의한 전환율 변화는 반응온도 35~55°C 사이에서 측정하였다.

팜유와 스테아르산으로부터 코코아 대용지 생성

AOT-핵산 용액(55 mM) 5 ml에 0.15g 팜유와 0.17g 스테아르산을 넣은 다음, 리파제 용액 49.5 μl(4.74 전환 역가)를 첨가하여 역마이셀을 제조한 다음 50°C에서 진탕하면서 각 트리글리세리드를 시간별로 측정하였다.

결과 및 고찰

HPLC에 의한 트리글리세리드 분석

Table 1, 2의 조건에서 표준곡선을 작성하여 시판중인 코코아 버터 2종, 코코아 대용지, 팜유에서 주요 트리

Table 3. Composition of major triglycerides of commercial fats (unit: μmole)

Triglyceride	Cocoa Butter ¹⁾	Cocoa Butter ²⁾	CBE ³⁾	Palm oil
OOO	—	—	—	trace
POO	trace	trace	trace	6.780
POP	6.763	4.481	4.823	9.507
SOO	trace	trace	trace	0.48
POS	10.965	6.096	3.592	2.206
SOS	7.516	3.239	3.912	trace

¹⁾de Zaan, ²⁾Bendrop, ³⁾Coberine

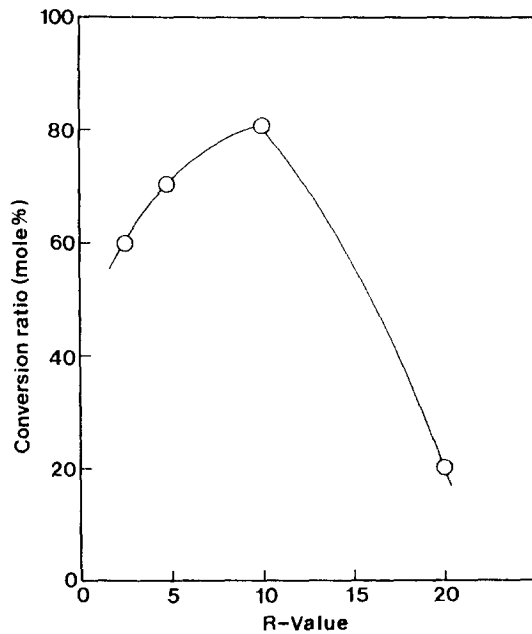


Fig. 1. Effect of R-Value on the conversion at 37°C for 24 hours

글리세리드 함량을 측정된 결과는 Table 3과 같다.

R value 변화에 따른 에스테르교환에 의한 전환율 변화

AOT-헥산 용액(55 mM)에 30 mM 트리올레인과 90 mM 스테아르산을 용해시키고, 이 용액에 대하여 각 R value에 해당하는 양의 수분이 되게 효소용액을 첨가하여 전환율을 측정된 결과(Fig. 1) R value 10에서 최대의 전환율을 보였다.

같은 반응계에서 가수분해의 경우⁽²¹⁾보다는 낮은 R value에서 최대의 전환율을 보였다. R value 10 이상에서 전환율이 급격하게 떨어지는 것은 계면활성제에 대한 물의 양이 많아 마이셀의 크기가 커져⁽²²⁾, 기질과 접촉하는 효소의 상대적 표면적이 줄어들어 유-수 계면에서만 작용하는 리파제⁽²⁴⁾의 역가가 줄어든 것으로 생각된다.

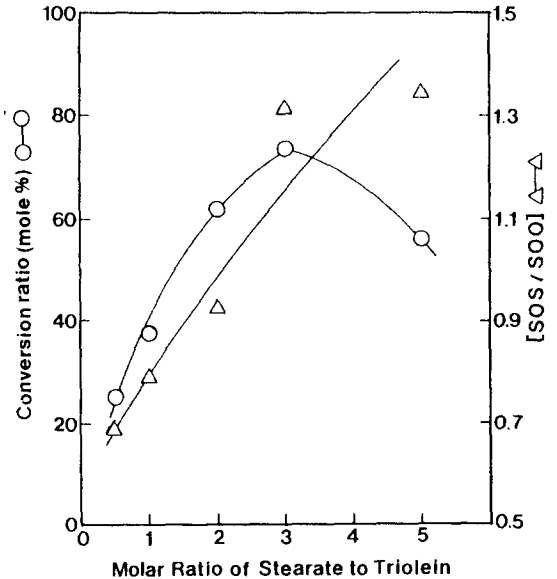


Fig. 2. Effect of molar ratio of stearic acid to triolein on the conversion and molar ratio of SOS to SOO at 37°C for 24 hours

트리올레인에 대한 스테아르산 첨가량에 따른 전환율 변화

트리올레인 10 mM에 대하여 스테아르산을 각각 5, 10, 20, 30, 50 mM씩 첨가하여 37°C에서 24시간 반응시킨 후 전환율을 측정하고, 생성된 트리글리세리드 1 mmole중 스테아르산이 2 mmole 치환된 것(SOS)과 1 mmole 치환된 것(SOO)의 비율도 측정하였다(Fig. 2).

이 결과 트리올레인에 대하여 스테아르산 첨가농도가 증가함에 따라 전환율이 초기에 급격히 증가하여 스테아르산농도가 30 mM일 때 전환율이 가장 높게 나타났고, 그 이후에는 완만한 감소를 보였다. 시간별로 트리글리세리드 양을 측정된 결과, 트리올레인 10 mM에 대하여 5 mM 스테아르산을 첨가한 경우(Fig. 3a)는 시간이 경과함에 따라 전체 트리글리세리드 양이 감소하는 것으로 보아 트리올레인에 스테아르산이 전이되는 속도보다 가수분해 속도가 빠르기 때문인 것으로 생각되고, 10 mM 트리올레인에 대하여 50 mM 스테아르산을 첨가한 경우(Fig. 3c)에는 전환이 이루어지는데 시간이 많이 소요되는 것을 알 수 있었다. 이는 트리글리세리드의 가수분해 기역반응으로 에스테르교환반응이 이루어지는 점을 감안하면 지방산 양 증가에 따라 가수분해 단계에서 효소가 지방산에 저해를 받기 때문인 것으로 생각된다. 트리글리세리드중 SOS/SOO비는 스테아르산 양이 증가함에 따라 점차적으로 증가하였다. 이 결과로부터 첨가하는 지방산의 양에 따라 최종산물의 지방산 치환정도를 조절할 수 있음을 알 수 있었다.

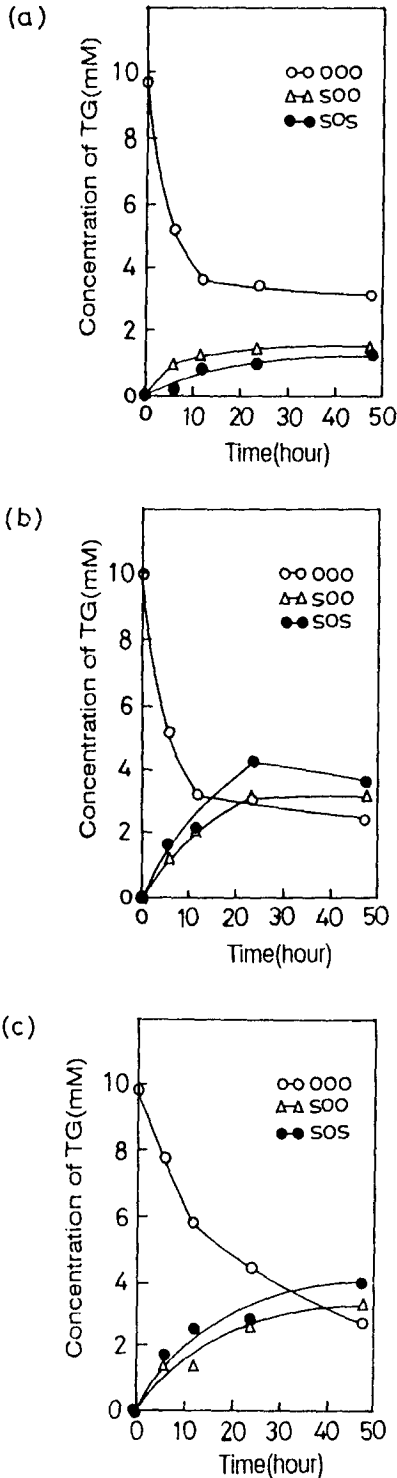


Fig. 3. Changes of amount of three triglycerides according to the reaction time

Amount of stearic acid added to 10 mM triolein was changed, (a) 5 mM, (b) 30 mM, (c) 50 mM

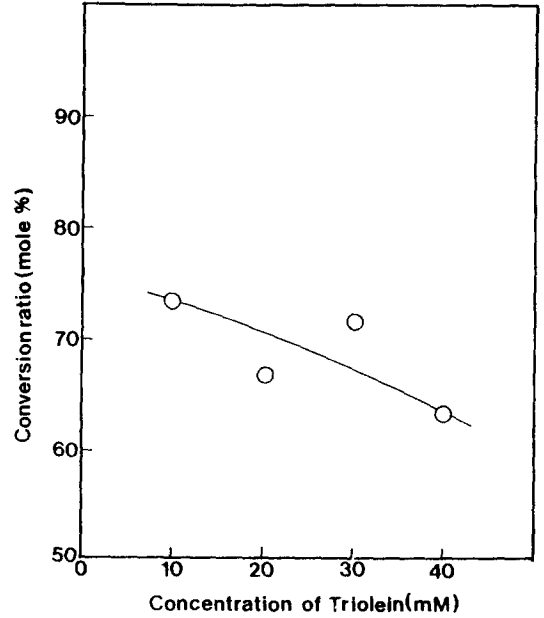


Fig. 4. Effect of triolein concentration on the conversion at 37°C for 24 hours

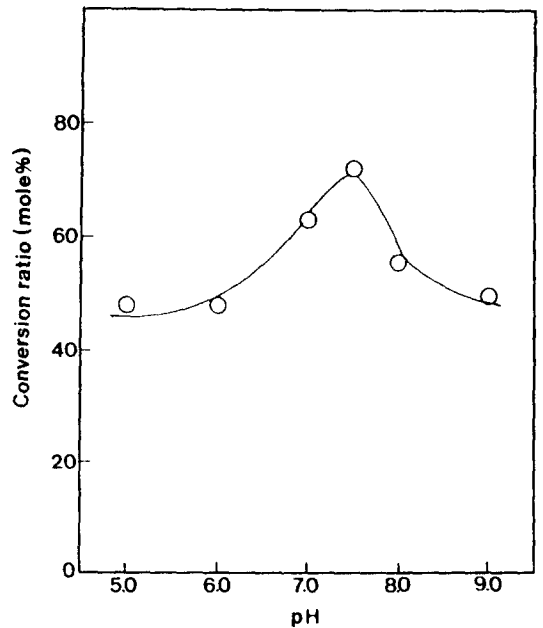


Fig. 5. Effect of pH on the conversion at 37°C for 24 hours

트리올레인 첨가량에 따른 전환율

트리올레인 양을 10~40 mM까지 변화시키면서 전환율을 측정된 결과는 Fig.4와 같다. 이때 첨가한 스테아르산 양은 트리올레인에 대하여 3배였고, 37°C에서 24

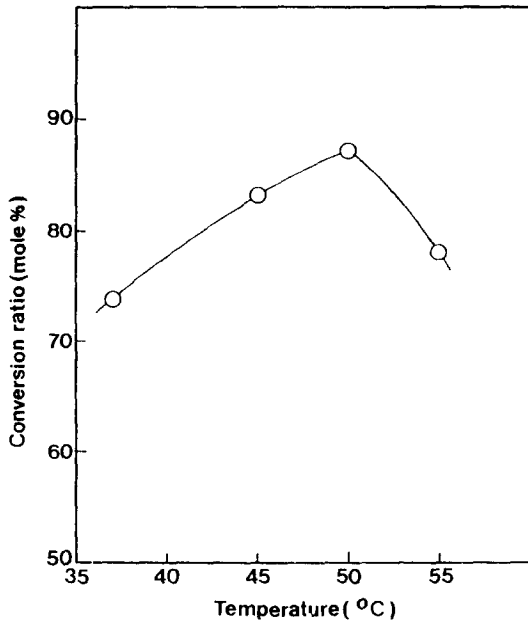


Fig. 6. Effect of temperature on the lipase-catalyzed conversion of triolein and stearic acid to SOO and SOS in AOT-reverse micelles

시간 반응시켰다. 24시간에서 첨가한 트리올레인 양이 증가할수록 전환율이 낮아지는 경향을 보였다.

pH 변화에 따른 에스테르 교환에 의한 전환율 변화

pH 5~9에서 전환율을 측정한 결과(Fig. 5), pH 7.5에서 최대의 전환율을 보였다. 이는 Kim 등⁽²¹⁾이 *R. arrhizus* 리파제를 이용한 트리글리세리드 가수분해반응에서 얻은 최적 pH와 유사하였다.

온도변화에 따른 에스테르 교환에 의한 전환율 변화

온도 37~55°C 사이에서 전환율을 측정한 결과는 Fig. 6과 같다. 이 결과 50°C에서 최대의 전환율을 보였다. 50°C 이상에서는 용매의 증발이 높아 실제 반응계의 운용에는 어려움이 있었다. 이 결과는 Kim 등⁽²¹⁾이 가수분해의 경우에서 얻은 최적온도인 30°C 보다는 높은 온도였다.

팜유와 스테아르산으로부터 코코아 대용지 생성

반응 최적온도인 50°C에서 팜유와 스테아르산으로부터 리파제에 의하여 감소 또는 생성, 증가되는 트리글리세리드를 시간별로 측정된 결과는 Fig. 7과 같다.

팜유 중의 POP, POO, SOO가 줄어든 반면 코코아 버터의 주요한 성분인 POS와 SOS가 생성됨을 알 수 있었다. 또한 본 연구에서 사용된 반응조건의 경우 24시간이면 반응이 완료되고, 그 이후에는 모든 트리글리세리드가 분해되어 에스테르교환반응의 수율이 낮아지는

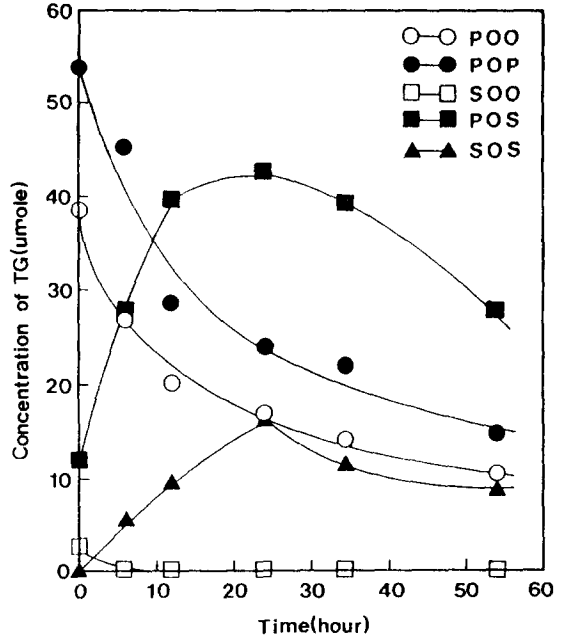


Fig. 7. Changes of triglyceride concentration when palm oil and stearic acid were treated with lipase in reverse micellar system at 50°C

Table 4. Mole percent of major triglycerides in commercial fats and enzyme reaction product (unit: mole%)

Triglyceride	Cocoa Butter ¹⁾	CBE ²⁾	Reaction Product
POP	32.43	39.12	24.15
POS	44.12	29.14	42.61
SOS	23.44	31.74	16.24

¹⁾Bendrop, ²⁾Croklaan

것으로 나타났다.

본 연구에서 얻은 반응 생성물과 상업유지(Table 3)의 POP, POS, SOS 조성을 살펴본 결과(Table 4), 시판 코코아 대용지보다 본 연구에 의한 반응 생성물의 트리글리세리드 조성이 코코아 버터에 더욱 유사함을 알 수 있었다. 다만, 유지의 용해성에 악영향을 미치는 POO⁽¹⁷⁾의 양을 더욱 줄이기 위해서는 중용점 팜유를 사용함⁽¹⁵⁾이 유리할 것으로 생각된다.

요 약

역마이셀-효소반응계에서 팜유와 스테아르산으로부터 *Rhizopus arrhizus* 리파제의 에스테르교환 반응에 의한 코코아 버터 대용지 생산을 위한 연구를 실시하였다. HPLC를 이용하여 각 트리글리세리드의 정성 및 정량 분석을 행하였다. 트리올레인과 스테아르산의 모델반응에서 Aerosol OT에 대한 물의 몰비율을 변화시켰을 때

그 비가 10일 때, 30 mM 트리올레인에 대하여 3배의 스테아르산을 첨가했을 때 최대의 전환율을 보였다. 또 pH는 7.5, 온도는 50°C에서 최대의 전환율을 보였다. 팜유와 스테아르산을 기질로 이용하였을 때는 팜유내의 POP, POO, SOO가 줄어든 반면 POS와 SOS가 생성, 증가되는 경향을 보였다. 본 연구에서 얻은 코코아 대용지의 POP, POS, SOS 등 트리글리세리드 조성은 시판되는 코코아 대용지보다 천연코코아 버터의 조성보다 더욱 유사하였다.

문 헌

1. Minifie, B.W.: Cocoa and Chocolate. In *Chocolate, Cocoa and Confectionery: Science and Technology*, 2nd ed., Minifie, B.W. ed., AVI Publishing Co. Inc., Westport, p.1(1982)
2. Weiss, T.J.: Commercial oil sources. In *Food Oils and Their Uses*, 2nd ed., AVI Publishing Co. Inc., Westport, p.51(1983)
3. 田中幸隆, 入夏裕一, 野口愛子, 小林孝: 카카오바타-대용組成物. 日本 特許 平2-46178(1990)
4. Kwon, D.Y. and Rhee, J.S.: Effect of organic solvents on lipase for interesterification of fats and oils. *Kor. J. Food Sci. Technol.*, 17, 490(1985)
5. 大村久雄, 入夏裕一, 野村誠治: 카카오바타-대용脂의製造方法. 日本 公開 特許 昭62-201999(1987)
6. 稻田祐二, 二見瑞子: 油脂의改質方法. 日本 公開 特許 昭62-151190(1987)
7. Inada, Y., Nishimura, H., Takahashi, K., Yoshimoto, T., Ranjan, A. and Saito, Y.: Ester synthesis catalyzed by polyethylene glycol-modified lipase in benzene. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 122, 845(1984)
8. Takahashi, K., Kodera, Y., Yoshimoto, T., Ajima, A., Matsushima, A. and Inada, Y.: Ester-exchange catalyzed by lipase modified with polyethylene glycol. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 131, 532(1985)
9. Yokozeki, K., Yamanaka, S., Takinami, K., Hirose, Y., Tanaka, A., Sonomoto, K. and Fukui, S.: Application of immobilized lipase to regio-specific interesterification of triglyceride in organic solvent. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 14, 1(1982)
10. Wisdom, R.A., Dunnill, P. and Lilly, M.D.: Enzymic interesterification of fats: laboratory and pilot-scale studies with immobilized lipase from *Rhizopus arrhizus*. *Biotechnol. Bioeng.*, 29, 1091(1987)
11. Bello, M., Thomas, D. and Legoy, M.D.: Interesterification and synthesis by *Candida cylindracea* lipase in miroemulsion. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 146, 361(1987)
12. Morita, S., Narita, H., Matoba, T. and Kito, M.: Synthesis of triacylglycerol by lipase in phosphatidyl choline reverse micellar system. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 61, 1571(1984)
13. Chi, Y.M., Nakamura, K. and Yano, T.: Enzymatic interesterification in supercritical carbon dioxide. *Agric. Biol. Chem.*, 52, 1541(1988)
14. Hoq, M.M., Takami, H., Yamane, T. and Shimisu, S.: Some characteristics of continuous glyceride synthesis by lipase in a microporous hydrophobic membrane bioreactor. *Agric. Biol. Chem.*, 49, 335(1985)
15. Horita, Y., Tanaka, Y. and Urata, K.: Esterification process of fats and oils and enzymatic preparation to use therein. United States Patent No.4,940,845(1990)
16. 松尾高明, 沢村紀夫, 橋本征雄: 카카오바타-대용脂의製造法. 日本 特許 昭57-27159(1982)
17. Bloomer, S., Adlercreutz, P. and Mattiasson, B.: Triglyceride interesterification by lipases. 1. cocoa butter equivalents from a fraction of palm oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 67, 519(1990)
18. Han, D.: Characteristics of lipase from *Candida rugosa* and hydrolysis of triglycerides by the enzyme in AOT-isooctane reversed micellar system. Ph.D. Thesis, KAIST(Korea) (1985)
19. Han, D., Kwon, D.Y. and Rhee, J.S.: Determination of lipase activity in AOT-isooctane reversed micelles. *Agric. Biol. Chem.*, 51, 615(1987)
20. Han, D., Rhee, J.S. and Lee, S.B.: Lipase reaction in AOT-isooctane reversed micelles: effect of water on equilibria. *Biotechnol. Bioeng.*, 30, 381(1987)
21. Kim, T. and Chung, K.: Some characteristics of palm kernel olein hydrolysis by *Rhizopus arrhizus* lipase in reversed micelles of AOT-isooctane, and additive effects. *Enz. Microb. Technol.*, 11, 528(1989)
22. Zulauf, M. and Eicke, H.: Inverted micelles and microemulsions in the ternary system H₂O/Aerosol OT /isooctane as studied by photon correlation spectroscopy. *J. Phys. Chem.*, 43, 480(1979)
23. 최수안, 박영호: 식물유의 Triglyceride 조성에 관한 연구. 한국식품과학회지, 14, 219(1982)
24. Whitaker, J.R.: The Esterases. In *Principles of Enzymology of The Food Sciences*, Marcel Dekker, Inc., New York, p.481(1972)

(1991년 9월 4일 접수)