

방사선 조사선량에 따른 lipase의 interesterification 반응특성 변화 연구

이치우 · 허윤지 · 이기택*

충남대학교 식품공학과

Studies of interesterification properties of irradiated lipases

Chi-Woo Lee, Yoon-Ji Heo, Ki-Teak Lee*

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

Received on 8 August 2013, revised on 28 August 2013, accepted on 16 September 2013

Abstract : This study was conducted to prove the effect of irradiation on lipases (lipase AK, lipase AH, lipase PS-D, Lipozyme TLIM, Lipozyme RMIM and Novozyme SP435) which were used for interesterification reaction using batch type reactor. Through such interesterification, structured lipid (1(3)-palmitoyl-2-oleoyl-3(1)-stearoyl, POS) was synthesized by lipase treated with irradiation at different doses (0, 3, 7, 14, 29 and 59 kGy) using canola oil, palmitic ethyl ester (PEE) and stearic ethyl ester (StEE). After the reaction, fatty acid composition of triacylglycerol (TAG) in structured lipid was analyzed to compare the lipase activity. The results showed that activity of the irradiated lipase AH, PS-D and Novozyme SP435 with certain dose (3 kGy) were slightly improved. Such change of lipase activity suggested that irradiation might affect on the interesterification properties. Especially, Lipase AK, Lipozyme TLIM and Lipozyme RMIM after at 3 kGy irradiation showed that content of stearic acid ($C_{18:0}$) was increased while palmitic acid ($C_{16:0}$) decreased in the interesterified products.

Key words : Irradiation, Lipase activity, Interesterification

I. 서 론

방사선조사는 특정 에너지를 이용하여 식품에 일정 시간 노출시켜 식품의 보존성과 안전성을 향상시키기 위하여 주로 사용된다. 이 중에서 감마선은 초단파장으로 높은 에너지를 가진다. 방사선조사식품은 방사선조사를 통하여 발아를 억제하고, 유해미생물과 해충을 살균, 사멸한 식품을 의미한다(Farkas, 1998).

이러한 식품의 주성분이 단백질 일 때, 방사선조사를 했을 경우 생성된 라디칼이 연쇄반응을 일으켜 단백질분자들이 단편화가 된다. 또한 물 분자에서 유래되는 hydroxy radical에 의해 단백질을 구성하는 아미노산에 이화학적 변화를 유도하여 구조변화를 일으킨다고 보고되었다(Wetzel et al., 1985; Lim et al., 1998).

*Corresponding author: Tel: +82-42-821-6729

E-mail address: ktlee@cnu.ac.kr

한편 Structured lipids(SLs)는 triacylglycerol(TAG)이 화학적 또는 효소적 반응에 의해 지방산의 조성이 바뀌거나 위치배열이 변하여 재구성 또는 변형되는 것을 뜻한다. 이때 사용되는 지방산의 종류에 따라 다양한 TAG종류를 합성 할 수 있다. 일반적으로 화학적인 방법에 의한 합성은 TAG의 acyl group이 무작위로 반응되고 부가반응 및 용매사용에 따른 위험성이 존재하지만 효소를 이용한 반응은 specific하고, 반응조건이 보다 완화하며 부가물 생성이 적은 장점이 있다(Macrae, 1983; Posorske, 1984; Lee and Akoh, 1998).

Lipase는 hydrolysis, interesterification, alcoholysis, acidolysis 등과 같은 반응에 biocatalyst로 사용될 수 있으며, natural oil, synthetic triglycerides, fatty acid ethyl ester와 같은 다양한 기질에 작용이 가능하다(Macrae, 1983). 또한 고정화 효소를 사용하면 재사용이 가능하여 생산비용을 줄일 수 있고, 효소와 기질의 분리가 용이하다.

고정화 효소는 열, pH, 용매에 관한 안정성이 powder lipase보다 높다. 그리고 고정화 효소는 위치 및 기질특이성, 이화학적 특성이 변할 수 있다(Wisdom et al., 1984; Cho and Rhee, 1993; Moon et al., 2011).

본 연구에서는 카놀라유와 palmitic ethyl ester, stearic ethyl ester를 방사선 조사선량을 달리하고, powder 효소, 고정화 효소를 이용하여 interesterification 반응을 진행하였다. 반응 후 반응물의 TAG의 지방산 조성, pancreatic lipase analysis에 의한 Sn-2 위치의 지방산 조성을 분석하였다. 이를 토대로 lipase에 방사선을 조사하였을 때 효소의 interesterification 반응 특성 변화를 살펴보았다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료 및 시약

본 연구에서 사용된 기질로는 카놀라유(canola oil, ca, Hunt Wesson, ConAgra Foods, Inc., Omaha, NE, USA)를 사용하였으며 C마트에서 구입하였다. Interesterification 반응에 이용한 palmitic ethyl ester(PEE, C_{16:0})와 stearic ethyl ester(StEE, C_{18:0})는 (주)네오메가(Deajeon, Korea)에서 제공받아 사용하였다. 반응에 사용된 비 고정화 효소는 powder형 효소인 lipase AK(from *Pseudomonas fluorescens*), AH(from *Burkholderia cepacia*)를 사용하였으며 고정화 효소는 lipase PS-D(from *Burkholderia cepacia*), Lipozyme TLIM(from *Thermomyces lanuginosus*), Lipozyme RMIM(from *Rhizomucor miehei*), Novozyme SP435(from *Candida antarctica*)를 사용하였고, Amano Enzyme Inc.(Nagoya, Japan)에서 제공받았다.

효소의 방사선 조사는 한국원자력연구원 방사선과학연구소(Jeonbuk, Korea)에서 시행하였으며 연구소 내 선원 11.1 PBq, ⁶⁰Co 감마선 조사기(point source AECL, IR-79, MDS Nordion International Co. Ltd, Ottawa, ON, Canada)를 사용하였다. 효소를 50 mL vial에 약 5 g을 넣은 후 실온에서 시간당 10 kGy의 선량율로 0, 3, 7, 14, 29 및 59 kGy의 흡수선량이 되도록 하였으며, Alanine dosimeter (5 nm, Bruker Instruments, Rheinstetten, Germany)를 이용하여 확인하였다. Dosimetry 시스템은 국제원자력기구(IAEA)의 규격에 따라 표준화 한 후 사용하였으며 최종 흡수선량의 오차는 2% 이내였다(Sung et al., 2011).

2. 효소의 수분활성 측정

각 효소와 방사선 조사된 효소의 수분활성도를 비교하기 위하여 각각 효소를 1 g씩 취했으며 Water activity tester(AQUA LAB, water activity tester, series 3TE, Decagon devices, Inc., USA)를 이용하여 측정하였다.

3. Interesterification 반응

방사선 조사 전 효소의 interesterification반응을 통하여 각 효소의 반응 특성을 알아보고 방사선 조사 후 반응 특성의 변화를 비교하기 위하여 batch type reactor를 이용하여 반응을 진행하였다. 반응기질로는 canola oil(Ca), palmitic ethyl ester(PEE), stearic ethyl ester(StEE)를 사용하여 1:1:1의 몰 비율로 총 10 g을 50 mL의 vial에 넣고 효소는 혼합된 총기질의 10%의 무게(1 g)를 사용하였다. 반응 조건은 46°C에서 200 rpm, 6시간으로 laboratory stirrer/hot plate(Corning, PC-420)와 항온수조(WBC 1506D, Jeio-tech, Korea)를 이용하여 반응하였다. 반응물을 취하여 PTFE syringe filter(25 mm, 0.5 um Watman, Maidstone, Kent, UK)로 여과한 뒤 냉장 온도에서 보관하였다.

4. 각 합성물의 triacylglycerol(TAG) 지방산 조성 분석

Interesteringation 반응을 통하여 생성된 합성물의 TAG 조성을 확인하고 효소의 반응 특성변화를 비교하기 위하여 thin layer chromatography(TLC)를 이용하여 분석하였다. Chloroform 200 μL에 반응물 50 μL을 넣고 vortex 한 후 TLC silica plate(20x20 cm, Merck KGaA, Darmstadt, Germany)에 전개용매(Petroleum ether : diethyl ether : acetic acid=90:10:1, v/v/v)를 이용하여 분리하였다. 전개된 TLC plate에서 TAG 부분을 취하여 스크류 캡이 있는 15 mL test tube에 넣은 후 methylation을 통하여 GC분석을 하였다. 0.5 N 수산화나트륨 용액(in ethanol) 1.5 mL을 넣고 30초간 vortex하여 95°C의 항온 수조에서 5분간 반응한 후 25~30°C로 냉각하였다. 그 후 BF₃-methanol을 2 mL 넣고 30초간 vortex하여 95°C의 항온수조에서 반응시킨 후에 다시 25~30°C로 냉각하였

다. 여기에 iso-octane 2 mL과 1 mL의 포화 NaCl 용액을 넣고 vortex 한 후에 원심분리기(2500 rpm으로 3분간)를 이용하여 두 개의 층으로 분리하고 상층 액을 취하여 sodium sulfate column을 사용하여 수분과 불순물을 제거하였다. 여기서 얻어진 methyl ester 형태의 지방산을 gas chromatography(YL6100GC, 6000 series, Younglin, Korea)를 이용하여 분석하였다(Moon et al., 2011). 분석에 사용된 gas chromatography의 조건으로 column은 SPTM-2560 (100 m × 0.25 mm × 0.2 μm film thickness, Supelco, Bellfonte, PA, USA)을 사용하였다. Detector로는 flame ionized detector(FID)를 사용하였으며 이때 detector의 온도는 260°C, injector의 온도는 250°C로 하였다. Oven의 온도는 150°C에서 5분간 유지한 후 1분당 4°C의 속도로 220°C까지 올려준 뒤, 30분간 유지하였다. Carrier gas로는 He을 flow rate 1 mL/min으로 사용하였고 시료는 1 uL를 GC에 주입하여 분석하였다(AOAC, 2001).

5. Pancreatic lipase를 이용한 triacylglycerol의 sn-2 position지방산 조성 분석

반응물의 sn-2 위치의 지방산 조성을 확인하기 위하여 sn-1,3 위치 특이성을 가지는 pancreatic lipase(from hog pancreas, Sigma Chemical Co., St. Lois, USA)를 이용하여 반응물을 가수분해하였다. 반응물을 스크류캡이 달린 15 mL test tube에 7 mg 취한 후, 7 mL의 1 M Tris-HCl buffer(pH 7.6)와 1.75 mL의 0.05% bile salt 용액, 0.7 mL의 2.2% CaCl₂ 용액, 7 mg의 pancreatic lipase를 넣었다. 이 혼합물을 vortex 한 후에 37°C의 항온수조에서 3분간 진탕 후 vortex를 2~3회 반복하였다. 그 후 diethyl ether 4 mL을 넣고 vortex 후에 원심분리기를 이용하여 두 개의 층으로 분리하고 상층 액을 sodium sulfate column을 사용하여 수분과 불순물을 제거하였다. 이를 TLC

silica plate(20x20 cm, Merck KGaA, Darmstadt, Germany)에 전개용매(hexane : diethyl ether : acetic acid=50:50:1)를 이용하여 분리하였다. 전개된 TLC plate에서 2-monoacyl-glycerol(MAG)부분을 취하여 BF₃-methanol을 이용해 methylation 후에 GC를 이용하였으며 GC 분석방법은 TAG 지방산 조성 분석방법과 같다(Lee and Akoh, 1996).

6. 통계처리

시료간의 유의적인 차이를 SAS(statistical analysis system, version 9.01)를 이용하여 Duncan's multiple range test를 통해 p<0.05수준에서 검증하였다(SAS Institute, Inc., 2002).

III. 결과 및 고찰

1. 방사선 조사에 따른 수분활성도 변화

Lipase는 수분활성도에 따라 그 효소의 interesterification 반응 활성이 변화하여 수분활성도가 중요하다(Valivety et al., 1992). 따라서 방사선 조사 후에 수분활성도의 변화를 확인하기 위해 각 효소의 수분활성도를 Table 1에 나타내었다. 전체적으로 방사선 조사를 하지 않은 대조군(0 kGy)과 비교하여 많은 차이가 보이지 않았으나 powder형 효소인 lipase AH의 경우 0 kGy에서 0.423으로 나타났고 방사선을 7 kGy 조사하였을 때 수분활성도는 0.521로 증가하였다. 한편, 29 및 59 kGy로 각각 조사하였을 때는 0.542와 0.478로 측정되었다. 특히, lipase AK는 0.428~0.434로 방사선 조사 전 후의 수분활성도 변화가 크게 보이지 않았다. 고정화 효소인 PS-D의 경우에는 수분활성도가 0.532~0.547 범위를 보였고, Novozyme SP435의 경우는 0 kGy에서 0.516이었으나 7, 29, 및 59 kGy로 조사하였을 때

Table 1. Water activity of powdered and immobilized lipases after different dose of irradiation.

	0 kGy	7 kGy	29 kGy	59 kGy
Lipase AH	0.423	0.521	0.542	0.478
Lipase AK	0.459	0.433	0.428	0.434
Lipase PS-D	0.532	0.543	0.542	0.547
Lipozyme TLIM	0.246	0.200	0.208	0.200
Lipozyme RMIM	0.428	0.317	0.322	0.347
Novozyme SP435	0.516	0.380	0.379	0.383

0.379–0.383으로 수분활성도가 낮아졌다. Lipozyme RMIM 경우에도 방사선 조사 전(0.428)보다 방사선을 조사한 후 수분활성도가 0.317–0.347 범위로 낮아졌다. 반면, Lipozyme TLIM의 경우 방사선 조사 전 후의 수분활성도 변화에 큰 차이가 없었다. 따라서 유지의 효소적 interesterification 반응을 시행하기 전 방사선 조사한 각 효소들의 수분활성도가 0.2–0.547의 범위로 나타났다.

2. 방사선 조사 후 powder형 효소 반응물의 triacylglycerol 조성변화

방사선을 조사 하지 않은 control(0 kGy)과 방사선 조사량에 따른 powder형 효소들의 반응 특이성 변화를 알아보기 위하여 interesterification반응을 통해 생성된 합성물의 triacylglycerol(TAG) 조성을 분석하였다. 먼저, lipase AH 합성물의 TAG 조성을 Table 2와 같이 나타내었다. 0 kGy의 경우 palmitic acid(C_{16:0})과 stearic acid(C_{18:0})의 함량이 14.64와 5.77 area%였으며, 3 kGy는 각각 17.41와 7.16 area%로 높은 경향을 보였다. 이후 59 kGy 조사량에서는 13.82와 5.64 area%로 나타나 방사선 조사선량이 많아질수록 이를 포화지방산의 함량이 감소하는 경향을 나타내었다. 또한, 합성물을 구성하는 TAG의 총 saturated fatty acid 함량은 3 kGy 조사량에서 24.57 area%로 가장

높게 나타났으며 59 kGy 조사량에서 19.46 area%로 가장 낮게 측정되었다. 한편, 방사선 조사 전과 방사선 조사량을 달리한 lipase AK의 interesterification 반응 후 TAG 조성을 Table 3에 나타내었다. 0 kGy에서는 palmitic acid(C_{16:0})과 stearic acid(C_{18:0})의 함량이 각각 11.55와 4.72 area%로 나타났고, 7–59 kGy로 방사선 조사한 lipase AK는 0 kGy의 그 결과와 유의적인 차이를 보이지 않았다. 그러나 3 kGy를 조사하였을 때의 palmitic acid와 stearic acid의 함량은 각각 7.79와 7.13 area%를 보이면서 방사선을 조사하지 않은 lipase AK를 이용한 반응보다 32.55% 감소와 51.06% 증가를 보였다. 총 saturated fatty acid 함량 또한 3 kGy 조사량에서 14.92 area%로 가장 낮게 나타났는데 이는 lipase AH와 마찬가지로 방사선 3 kGy조사량에서 효소의 입체특이성이 다소 변하였기 때문으로 생각된다 (Macrae, 1983).

3. 방사선 조사 후 고정화 효소 반응물의 triacylglycerol 조성변화

방사선 조사량에 따른 고정화 효소인 lipase PS-D의 interesterification반응 결과를 Table 4에 나타내었다. 0 kGy에서의 palmitic acid(C_{16:0})과 stearic acid(C_{18:0})의 함량은 각각 22.69와 14.20 area%였으며, 3 kGy를 조사하였

Table 2. Fatty acid compositions of interesterified products catalyzed by lipase AH after different dose of irradiation (0, 3, 7, 14, 29, 59 kGy).

Fatty acid (Area%)	Lipase AH					
	0 kGy	3 kGy	7 kGy	14 kGy	29 kGy	59 kGy
C16:0	14.64 ±0.11 ^c	17.41 ±0.30 ^a	14.63 ±0.00 ^c	14.91 ±0.12 ^b	15.34 ±0.34 ^b	13.82 ±0.02 ^d
C18:0	5.77 ±0.08 ^b	7.16 ±0.40 ^a	5.81 ±0.50 ^b	6.30 ±0.01 ^b	6.36 ±0.42 ^{ab}	5.64 ±0.24 ^b
C18:1	55.75 ±0.56 ^{cd}	62.21 ±0.39 ^a	55.53 ±0.44 ^d	56.72 ±0.40 ^c	59.47 ±0.10 ^b	56.31 ±0.51 ^{cd}
C18:2	17.24 ±0.13 ^a	11.39 ±0.25 ^d	17.34 ±0.10 ^a	16.17 ±0.20 ^b	14.86 ±0.17 ^c	17.37 ±0.26 ^a
C18:3	6.61 ±0.39 ^a	1.83 ±0.06 ^d	6.69 ±0.16 ^a	5.91 ±0.35 ^b	3.97 ±0.01 ^c	6.85 ±0.01 ^a
ΣSFA ¹⁾	17.40	24.57	20.44	21.21	21.70	19.46
ΣUSFA ²⁾	79.60	75.43	79.56	78.79	78.30	80.54

All result values are mean±SD (n=2).

¹⁾ΣSFA: Total saturated fatty acid (area%)=palmitic acid (C_{16:0}, area%)+stearic acid (C_{18:0}, area%).

²⁾ΣUSFA: Total unsaturated fatty acids=oleic acid (C_{18:1}, area%)+linoleic acid (C_{18:2}, area%)+linolenic acid (C_{18:3}, area%).

^{a-d}Values within the same row without a common letter are significant different by Duncan's multiple range test at p <0.05.

Table 3. Fatty acid compositions of interesterified products catalyzed by lipase AK after different dose of irradiation (0, 3, 7, 14, 29, 59 kGy).

Fatty acid (Area%)	Lipase AK					
	0 kGy	3 kGy	7 kGy	14 kGy	29 kGy	59 kGy
C16:0	11.55 ±0.04 ^b	7.79 ±0.23 ^c	11.84 ±0.30 ^{ab}	11.83 ±0.05 ^{ab}	12.36 ±0.21 ^a	11.24 ±0.38 ^b
C18:0	4.72 ±0.39 ^{bc}	7.13 ±0.34 ^a	4.34 ±0.02 ^c	4.95 ±0.06 ^b	4.74 ±0.01 ^{bc}	4.45 ±0.22 ^{bc}
C18:1	59.43 ±0.29 ^c	73.43 ±0.07 ^a	59.04 ±0.52 ^c	58.59 ±0.24 ^c	62.11 ±1.34 ^b	59.22 ±0.13 ^c
C18:2	17.27 ±0.48 ^a	10.45 ±0.34 ^c	17.68 ±0.21 ^a	17.42 ±0.22 ^a	16.09 ±0.65 ^b	17.78 ±0.25 ^a
C18:3	7.05 ±0.23 ^a	1.20 ±0.32 ^c	7.12 ±0.40 ^a	7.21 ±0.01 ^a	4.71 ±0.48 ^b	7.32 ±0.22 ^a
ΣSFA ¹⁾	16.26	14.92	16.17	16.78	17.09	15.69
ΣUSFA ²⁾	83.74	85.08	83.83	83.22	82.91	84.31

All result values are mean±SD (n=2).

¹⁾ΣSFA: Total saturated fatty acid (area%)=palmitic acid (C_{16:0}, area%)+stearic acid (C_{18:0}, area%).

²⁾ΣUSFA: Total unsaturated fatty acids=oleic acid (C_{18:1}, area%)+linoleic acid (C_{18:2}, area%)+linolenic acid (C_{18:3}, area%).

^{a-d}Values within the same row without a common letter are significant different by Duncan's multiple range test at p <0.05.

Table 4. Fatty acid compositions of interesterified products catalyzed by lipase PS-D after different dose of irradiation (0, 3, 7, 14, 29, 59 kGy).

Fatty acid (Area%)	Lipase PS-D					
	0 kGy	3 kGy	7 kGy	14 kGy	29 kGy	59 kGy
C16:0	22.69 ±0.07 ^b	24.78 ±0.08 ^a	22.69 ±0.01 ^b	22.54 ±0.32 ^b	20.70 ±0.31 ^c	20.52 ±0.16 ^c
C18:0	14.20 ±0.04 ^b	15.43 ±0.50 ^a	12.76 ±0.28 ^c	14.38 ±0.16 ^b	12.38 ±0.23 ^{cd}	11.89 ±0.01 ^d
C18:1	45.75 ±0.23 ^e	47.65 ±0.14 ^c	46.95 ±0.04 ^d	45.42 ±0.08 ^f	48.28 ±0.12 ^b	49.02 ±0.05 ^a
C18:2	12.62 ±0.40 ^b	9.91 ±0.17 ^c	12.79 ±0.27 ^{ab}	12.59 ±0.06 ^b	13.41 ±0.22 ^a	13.36 ±0.21 ^a
C18:3	4.74 ±0.15 ^a	2.24 ±0.26 ^b	4.81 ±0.03 ^a	5.07 ±0.34 ^a	5.23 ±0.22 ^a	5.23 ±0.08 ^a
ΣSFA ¹⁾	36.89	40.20	35.45	36.92	33.08	32.40
ΣUSFA ²⁾	63.11	59.80	64.55	63.08	66.92	67.60

All result values are mean±SD (n=2).

¹⁾ΣSFA: Total saturated fatty acid (area%)=palmitic acid (C_{16:0}, area%)+stearic acid (C_{18:0}, area%).

²⁾ΣUSFA: Total unsaturated fatty acids=oleic acid (C_{18:1}, area%)+linoleic acid (C_{18:2}, area%)+linolenic acid (C_{18:3}, area%).

^{a-d}Values within the same row without a common letter are significant different by Duncan's multiple range test at p <0.05.

을 때는 24.78과 15.43 area%로 나타나 방사선 조사 전보다 약 10%씩 증가하였다. 또한, 총 saturated fatty acid 함량이 방사선 조사량(0~59 kGy)에 따라 32.40~40.20 area%의 범위로 나타났으며, 3 kGy에서 가장 높았다. 한편, Novozyme SP435도 이와 유사한 경향을 나타내었다 (Table 5). 0 kGy의 palmitic acid와 stearic acid의 함량은

각각 20.57과 18.04 area%로 나타났으며, 방사선 조사 3 kGy에서는 22.74와 18.64 area%로 palmitic acid는 증가한 반면, stearic acid는 0 kGy와 유의적 차이를 보이지 않았다. 그러나 총 saturated fatty acid의 함량이 3 kGy에서 41.38 area%로 가장 높아 방사선을 조사하였을 때 효소의 활성이 증가하는 것으로 생각되었으나 7 kGy 이상(7~59

Table 5. Fatty acid compositions of interesterified products catalyzed by lipase SP435 after different dose of irradiation (0, 3, 7, 14, 29, 59 kGy).

Fatty acid (Area%)	Novozyme SP435				
	0 kGy	3 kGy	7 kGy	29 kGy	59 kGy
C16:0	20.57	22.74	19.94	20.91	19.48
	±0.77 ^c	±0.46 ^a	±1.06 ^b	±0.34 ^b	±0.12 ^b
C18:0	18.04	18.64	18.05	16.75	15.84
	±0.10 ^a	±0.22 ^a	±0.27 ^a	±0.45 ^b	±0.08 ^c
C18:1	41.58	46.08	41.81	44.65	43.28
	±0.52 ^d	±0.03 ^a	±0.27 ^d	±0.11 ^b	±0.55 ^c
C18:2	14.23	10.52	14.35	13.77	15.23
	±0.81 ^a	±0.50 ^b	±1.22 ^a	±0.15 ^a	±0.03 ^a
C18:3	5.59	2.02	5.85	3.92	6.17
	±0.59 ^a	±0.20 ^c	±0.38 ^a	±0.22 ^b	±0.32 ^a
ΣSFA	38.61	41.38	37.99	37.66	35.32
ΣUSFA	80.66	58.62	62.01	62.34	64.68

All result values are mean±SD (n=2).

¹⁾ΣSFA: Total saturated fatty acid (area%)=palmitic acid (C_{16:0}, area%)+stearic acid (C_{18:0}, area%).²⁾ΣUSFA: Total unsaturated fatty acids=oleic acid (C_{18:1}, area%)+linoleic acid (C_{18:2}, area%)+linolenic acid (C_{18:3}, area%).^{a-d}Values within the same row without a common letter are significant different by Duncan's multiple range test at p <0.05.**Table 6.** Fatty acid compositions of interesterified products catalyzed by lipase TLIM after different dose of irradiation (0, 3, 7, 14, 29, 59 kGy).

Fatty acid (Area%)	Lipozyme TLIM					
	0 kGy	3 kGy	7 kGy	14 kGy	29 kGy	59 kGy
C16:0	21.68	8.92	21.37	21.20	20.41	20.80
	±0.06 ^a	±0.76 ^c	±0.02a ^b	±0.04 ^{ab}	±0.08 ^b	±0.09 ^{ab}
C18:0	17.47	26.27	18.14	18.35	18.14	18.04
	±0.01 ^b	±1.15 ^a	±0.00 ^b	±0.13 ^b	±0.37 ^b	±0.07 ^b
C18:1	40.70	52.33	40.18	41.19	41.24	40.73
	±0.64 ^b	±1.23 ^a	±0.18 ^b	±0.18 ^b	±0.04 ^b	±0.12 ^b
C18:2	14.53	10.68	14.51	14.11	14.59	14.66
	±0.58 ^a	±2.17 ^b	±0.13 ^a	±0.11 ^a	±0.19 ^a	±0.13 ^a
C18:3	5.64	1.82	5.80	5.15	5.63	5.78
	±0.11 ^a	±0.97 ^b	±0.07 ^a	±0.02 ^a	±0.13 ^a	±0.17 ^a
ΣSFA	39.14	35.18	39.51	39.55	38.55	38.84
ΣUSFA	60.86	64.82	60.49	60.45	61.45	61.16

All result values are mean±SD (n=2).

¹⁾ΣSFA: Total saturated fatty acid (area%)=palmitic acid (C_{16:0}, area%)+stearic acid (C_{18:0}, area%).²⁾ΣUSFA: Total unsaturated fatty acids=oleic acid (C_{18:1}, area%)+linoleic acid (C_{18:2}, area%)+linolenic acid (C_{18:3}, area%).^{a-d}Values within the same row without a common letter are significant different by Duncan's multiple range test at p <0.05.

kGy)의 조사량에서는 35.32–37.99 area%로 활성이 감소하는 것으로 판단된다. 한편, Lipozyme TLIM의 경우 0 kGy에서의 palmitic acid와 stearic acid의 함량은 각각 21.68과 17.47 area%로 나타났으며, 3 kGy조사 시 palmitic acid의 함량이 8.92 area%로 감소하였고, stearic acid는 26.27 area%로 증가하였다(Table 6). 이는 방사선 3 kGy

조사량에서 효소의 입체특이성이 변한 것으로 보이며, 각 기질에 대한 특이성에도 변화를 보인 것으로 보여진다 (Jaeger et al., 1994). 그러나 방사선 조사 7–59 kGy에서는 palmitic acid와 stearic acid의 함량이 방사선 조사 전과 유의적인 차이를 보이지 않았으며 총 saturated fatty acid 함량은 3 kGy 조사량에서 35.18 area%로 가장 낮게

Table 7. Fatty acid compositions of interesterified products catalyzed by lipase RMIM after different dose of irradiation (0, 3, 7, 14, 29, 59 kGy).

Fatty acid (Area%)	Lipozyme RMIM				
	0 kGy	3 kGy	7 kGy	29 kGy	59 kGy
C16:0	21.29	8.38	20.06	19.05	19.19
	±1.46 ^a	±0.29 ^b	±1.51 ^a	±0.01 ^a	±0.10 ^a
C18:0	16.96	24.71	17.28	17.29	17.20
	±0.61 ^b	±0.11 ^a	±0.59 ^b	±0.06 ^b	±0.08 ^b
C18:1	42.19	54.42	41.39	42.11	42.39
	±1.03 ^b	±0.58 ^a	±1.32 ^b	±0.11 ^b	±0.28 ^b
C18:2	14.83	10.97	15.24	15.60	15.24
	±0.51 ^a	±0.64 ^b	±1.24 ^a	±0.11 ^a	±0.25 ^a
C18:3	4.74	1.52	6.03	5.96	5.98
	±0.53 ^a	±0.34 ^b	±0.98 ^a	±0.18 ^a	±0.04 ^a
ΣSFA	38.25	33.08	37.34	36.33	36.39
ΣUSFA	61.75	66.92	62.66	63.67	63.61

All result values are mean±SD (n=2).

¹⁾ΣSFA: Total saturated fatty acid (area%)=palmitic acid (C_{16:0}, area%)+stearic acid (C_{18:0}, area%).

²⁾ΣUSFA: Total unsaturated fatty acids=oleic acid (C_{18:1}, area%)+linoleic acid (C_{18:2}, area%)+linolenic acid (C_{18:3}, area%).

^{a-d}Values within the same row without a common letter are significant different by Duncan's multiple range test at p <0.05.

나타났다. 또한, Lipozyme RMIM도 Lipozyme TLIM과 유사한 경향을 보였으며 interesterification반응 후 TAG조성을 Table 7에 나타내었다. 0 kGy의 palmitic acid와 stearic acid의 함량은 각각 21.29와 16.96 area%로 나타났으나, 3 kGy조사 시 8.38과 24.71 area%로 Lipozyme TLIM과 마찬가지로 palmitic acid에서는 함량이 감소하지만, stearic acid에서는 함량이 증가 한 것을 확인하였다. 이는 3 kGy으로 조사할 경우 stearic acid에 대한 반응성이 더 증가하는 것으로 장쇄지방산이 더 합성이 잘 되는 것으로 생각된다(Stamatis et al., 1993). 반면, 방사선 조사 7~59 kGy에서는 palmitic acid와 stearic acid의 함량이 방사선조사 전과 유의적 차이를 보이지 않았다.

4. 방사선 조사 후 각 효소 반응물의 sn-2 position 조성변화

방사선 조사에 따른 각 효소의 위치특이성(sn-1, 3 위치 특이성)의 변화를 확인하기 위하여 sn-2 위치의 지방산 조성을 GC를 이용하여 분석하였으며 Fig. 1에 나타내었다. 한편, 기질로 사용된 canola oil의 총 지방산 조성은 palmitic acid 5.67 area%, stearic acid 2.29 area%, oleic acid 61.94 area%, linoleic acid 20.98 area%와 linolenic acid 9.12 area%로 구성되었으며 특히 sn-2 position에서

palmitic acid와 stearic acid는 검출되지 않았다. Lipase AH(Fig. 1-(A))의 경우 14 kGy에서 palmitic acid 6.00 area%, stearic acid 2.50 area%로 가장 높게 나타났으나 0~59 kGy는 비교적 유사하게 나타난 것으로 보인다. 한편, Lipase PS-D(Fig. 1-(B))는 3~59 kGy에서 총 포화지방산의 함량이 34.16~28.47 area%로 조사선량이 많아질수록 0 kGy(36.04 area%)보다 감소하는 경향을 나타내었으며 이는 방사선 조사에 따른 TAG 조성의 변화에 기인한 것으로 보인다. 또한 Novozyme SP435(Fig. 1-(F))도 유사한 경향을 나타내었는데 0 kGy에서 palmitic acid가 15.11 area%, stearic acid가 12.14 area%였으며 3 kGy와는 유의적 차이가 없었다. 하지만 7~59 kGy로 방사선 조사량이 증가 할수록 함량이 감소하는 경향을 나타내었다. Lipozyme RMIM(Fig. 1-(E))의 경우 3 kGy와 7 kGy에서 palmitic acid의 함량과 stearic acid의 함량이 증가하였지만 그 변화가 미미하여 방사선조사에 따른 함량 변화가 크지 않았다. 반면에 Lipozyme TLIM(Fig. 1-(D))은 7~59 kGy의 palmitic acid와 stearic acid의 함량이 0 kGy와 유사하게 나타났으나 특히 3 kGy에서 palmitic acid의 함량은 4.23 area%로 감소하였고, stearic acid는 10.76 area%로 증가하였다. 이는 TAG분석 결과(Table 5)에 따르면, 3 kGy에서 palmitic acid는 감소하고 stearic acid가 상대적으로 증가하였고 이로 인하여 sn-2 position도 같은

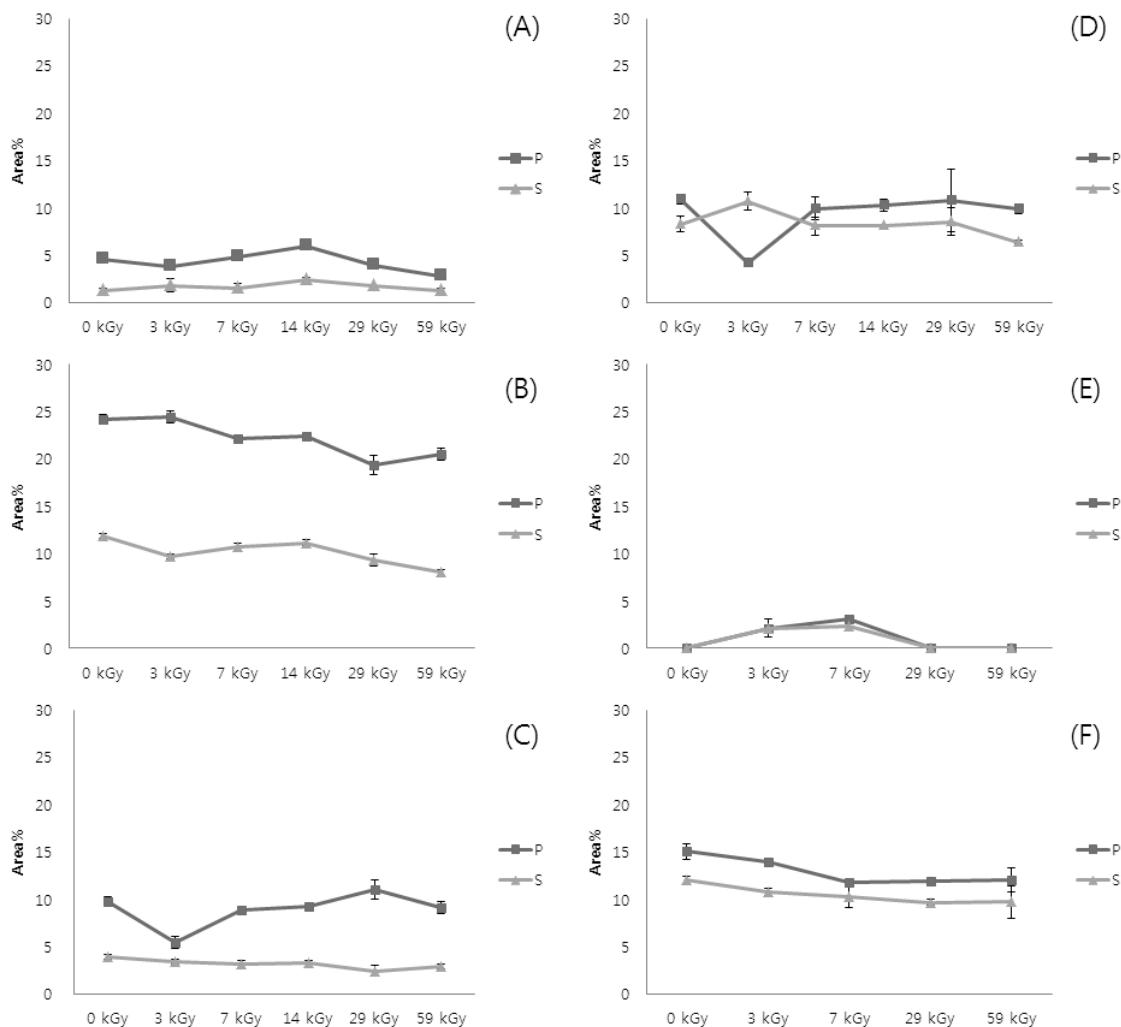


Fig. 1. Incorporation of palmitic acid and stearic acid in interesterified products by each lipase-catalyzed reaction with different irradiation doses (0, 3, 7, 14, 29, 59 kGy).
 P: palmitic acid ($C_{16:0}$), S: stearic acid ($C_{18:0}$).
 (A) lipase AH; (B) lipase PS-D; (C) lipase AK; (D) Lipozyme TLIM; (E) Lipozyme RMIM; (F) Novozyme SP435.

경향으로 나타난 것으로 보인다. 또한 lipase AK(Fig. 1-(C))도 Lipozyme TLIM과 유사한 경향을 나타내었는데 0, 7, 14, 29와 59 kGy는 큰 변화가 없었지만 3 kGy에서 palmitic acid의 함량이 5.54 area%로 감소하였다.

IV. 결 론

본 연구는 방사선 조사량에 따른 lipase의 interesterification 반응을 통해 lipase의 활성을 확인하고자 각 효소에 방사선을 조사하였다. 또한, 합성물들의 TAG 및 sn-2 position 분석을 위해 gas chromatography를 이용하여 효소의 반응 특이성 변화 연구를 진행하였다. 그 결과 각 효소

를 이용하여 interesterification 반응을 진행한 합성물의 분석결과가 다르게 나타났는데 lipase AH, PS-D와 Novozyme SP435의 경우 0 kGy보다 3 kGy에서 효소의 활성이 증가하였으며 7-59 kGy에서는 점차 감소되는 경향을 나타내었다. 하지만 0 kGy 보다는 효소의 활성이 높은 것으로 보아 방사선을 일정량 조사 할 시 효소의 활성을 증가하는 것으로 판단된다. 한편, lipase AK, Lipozyme TLIM와 Lipozyme RMIM의 경우는 7-59 kGy 조사량에서는 0 kGy에서의 지방산 조성과 유의적인 차이를 보이지 않았지만, 3 kGy 조사량에서는 stearic acid($C_{18:0}$)의 함량은 증가하고 palmitic acid($C_{16:0}$)의 함량은 감소하였으며 이는 방사선 조사의 영향으로 효소의 기질특이성이 변화한 것으로 여겨진다. 따라

서 본 실험에서는 3 kGy를 조사했을 때 interesterification 반응 효율이 가장 크게 변화하는 것으로 나타났다. 또한 sn-2 position의 조성은 각 효소의 합성물의 TAG조성에 따라 palmitic acid와 stearic acid의 함량이 변화하는 것으로 보아 효소의 sn-1,3 특이성이 변화하지 않은 것으로 나타났다.

감사의 글

이 논문은 2013년 미래창조과학부의 방사선기술개발사업 재원으로 지원을 받아 수행된 연구임(한국원자력연구원 2012M2A2A6011335).

참 고 문 헌

- Association of Official Analytical Chemists(AOAC). 2001. Official Method 996.06 Fat(total, saturated, and unsaturated) in foods.
- Cho SW, Rhee JS. 1993. Immobilization of lipase for effective interesterification of fats and oils in organic solvent. *Biotechnology and Bioengineering* 41(2):204-210.
- Farkas J. 1998. Irradiation as a method for decontaminating food A review. *International Journal of Food Microbiology* 44(3):189-204.
- Jaeger KE, Ransac S, Dijkstrab BW, Colson C, Van Heuvel M, Misser O. 1994. Bacterial lipases. *FEMS Microbiology Reviews* 151:29-63.
- Lee KT, Akoh CC. 1996. Immobilized lipase-catalyzed production of structured lipids with eicosapentaenoic acid at specific positions. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 73(5):611-615.
- Lee KT, Akoh CC. (1998). Structured lipids: synthesis and applications. *Food Reviews International* 14(1):17-34.
- Lim SI, Yook HS, Yoon HH, Kim YJ, Byun MW. 1998. Effect of gamma irradiation on egg white protein. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition* 27(2): 291-295.
- Macrae AR. 1983. Lipase-catalyzed interesterification of oils and fats. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 60(2):291-294.
- Moon JH, Lee JH, Shin JA, Hong ST, Lee KT. 2011. Optimization of lipase-catalyzed production of structured lipids from canola oil containing similar composition of triacylglycerols to cocoa butter. *Journal of The Korean Society of Food Science and Nutrition* 40(10):1430-1437.
- Posorske LH 1984. Industrial-scale application of enzymes to the fats and oil industry. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 61(11):1758-1760.
- SAS Institute, Inc. 2002. SAS/STAT User's Guide release 9.01. Statistical analysis systems institute. Cary NC, USA.
- Stamatis H, Xenakis A, Provelegiou M, Kolisis FN, 1993. Esterification reactions catalyzed by lipases in micro-emulsions: The role of enzyme localization in relation to its selectivity. *Biotechnology and Bioengineering* 42:103-110.
- Sung NY, Choi JI, Song BS, Kim JK, Lee JW, Byun MW, Kim MJ, Kim HJ. 2011. Tumor cell cytotoxicity of gamma irradiated chaga mushroom extract. *Journal of Radiation Industry* 5(1):35-39.
- Valivety, Rao H., Peter J. Halling, Alan D. Peilow, and Alasdair R. Macrae. 1992. Lipases from different sources vary widely in dependence of catalytic activity on water activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology* 1122(2):143-146.
- Wetzel K, Huebner G, Baer M. 1985. Irradiation of onions, spices and enzyme solutions in the German Democratic Republic. In INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Food irradiation processing: proceedings of an international symposium. Washington. pp. 4-8.
- Wisdom RA, Dunnill P, Lilly MD, Macrae A. 1984. Enzymic interesterification of fats: factors influencing the choice of support for immobilized lipase. *Enzyme and Microbial Technology* 6(10):443-446.
- Yook HS, Lee HJ, Im SI, Kim S, Byun MW. 1997. Changes of proteolytic enzyme property by gamma irradiation. *Journal of The Korean Society of Food Science and Nutrition* 26(6):1116-1121.