KOREAN JOURNAL OF 한국식품과학회지 FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY

©The Korean Society of Food Science and Technology

Amberlite에 고정화된 Lipase 제조 및 효소적 Interesterification을 이용한 반응 특성 연구

박소라・이기택*

충남대학교 식품공학과

Immobilization of Lipases on Amberlite and Their Interesterification Reaction Characteristics

So Ra Park and Ki Teak Lee*

Department of Food Science and Technology, Chungnam National University

Abstract Immobilized lipases were prepared by physical adsorption using lipase AK, AY, AH, PS and R on Amberlite[®]XAD[®]7 HP resin. With the immobilized lipases (10%), structured lipid was synthesized by enzymatic interesterification of canola oil, palmitic ethyl ester, and stearic ethyl ester in order to study the reaction characteristics. Among the lipase, the highest protein content was obtained from lipase AH (11.41%) before immobilization, while the highest levels of bound protein was observed from immobilized lipase AK (63.91%). Immobilized lipase AK had the highest interesterification activity (38.3% of total saturated fatty acid). Lipase AK was also used for a continuous reaction in which the slow flow of reactant resulted in increased reaction rate. Reusability of immobilized AK, AH and PS increased at the second reaction (120-196.5%). However, the activity of immobilized AH and PS was maintained until the sixth reaction.

Keywords: immobilized lipase, adsorption, support, continuous reactor, enzymatic interesterification

서 론

반응 중에 일어날 수 있는 물리, 화학적 변화로부터 활성을 유 지하기 위하여 효소를 불용성의 support에 부착시키는 것을 효소 고정화(immobilization)라 하며, 이와 같이 고정화된 효소는 재사 용이 용이하다(1-3). 현재까지 효소 고정화에 관한 많은 연구들이 수행되어 왔으며 이 때 주로 사용되었던 고정화 방법으로는 adsorption (4), encapsulation (5), covalent attachment (6), crossliking법(7) 등이 있다. Adsorption법은 다른 방법들에 비하여 비 교적 간단하면서도 불활성화 정도가 적지만, 효소와 유기용매에 불용성인 support간의 비교적 약한 결합력에 의해 반응 중 desorption(탈착)될 가능성이 높다. 또한, 효소의 구조적 변화와 active site에서 기질의 접근가능성이 감소하여 고정화 전 효소(즉, free lipase)에 비하여 활성이 감소하기도 한다(8). Adsorption법을 이용 하여 고정화할 경우 사용되는 support로는 polypropylene powder, amberlite XAD-7, porous glass (9), anion exchange resins (10), CaCO₃ (11), porous chitosan beads (12,13) 등이 보고되고 있는데 이들 중에서 amberlite XAD-7는 acrylic ester의 형태인 중간 극성

*Corresponding author: Ki Teak Lee, Department of Food Science and Technology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea Tel: 82-42-821-6729 Fax: 82-42-821-6721 E-mail: ktlee@cnu.ac.kr Received August 8, 2013; revised February 7, 2014; accepted February 23, 2014 을 가지는 polymeric adsorbent로 열과 물리적 충격에 비교적 안 정하다. 이처럼 support의 성질은 효소의 활성 및 재사용을 결정 하는 중요한 요인이므로(1), 고정화 시 support를 선택할 때 물리, 화학적 안정성, support의 내부 구조 및 표면적, pore size, support 와 효소간의 affinity등의 요인들을 고려하여야 한다(8).

어떠한 lipase (glycerol ester hydrolase, E.C. 3.1.1.3)는 가수분 해와 에스테르반응을 동시에 수행하기 때문에 유지를 가공할 때 사용될 수 있으며 이들 lipase는 기질인 유지의 불포화도, triacylglycerol (TAG) 내에 존재하는 지방산의 위치적 분포 및 acyl chain 의 길이 등에 따라 기질 선택성을 가진다(8). 따라서 interesterification과 같은 반응에서 lipase는 기질인 유지의 TAG 구성 지방 산을 무작위 또는 선택적으로 재배열시켜서 유지의 물리적 또는 화학적 특성을 변화시킬 수 있다(14).

이와 같이 구성 지방산이 재배열된 TAG들을 재구성 지질 (structured lipid, SL)이라고 하며 SL은 유지의 물리적, 화학적 특 성을 바꾸거나 공업적 또는 영양학적 특성을 향상시키기 위하여 유지의 주성분인 TAG의 지방산 조성이나 위치를 글리세를 분자 안에서 재배열한 유지이다. 이를 위한 방법으로는 interesterification 반응이 그 예이다(8,15). 한편, 효소반응의 기질 특이성을 이용하 기 위해서 주로 lipase를 이용한 효소적 합성을 하는데 특히, 미 생물에서 유래된 lipase는 경제성을 확보하면서 대량 생산이 가 능하기 때문에 산업적으로 널리 이용된다(16).

본 연구에서는 미생물로부터 유래된 free lipase와 이들로부터 adsorption법을 이용하여 제조한 immobilized lipase들의 효소적 interesterification 반응 특성과 재사용성(reusability)을 관찰하고자 하였다. 이를 위하여 카놀라유(canola oil)와 palmitic ethyl ester

(PEE), stearic ethyl ester (StEE)를 기질로 사용하였다. 이 중 카 놀라유의 경우 TAG 분자의 sn-2 위치에 올레인산(oleic acid)의 함량이 많으며 TAG의 조성이 주로 triolein (OOO)로 이루어져 있 으므로 lipase를 이용한 효소적 합성 시 위치적 특이성의 유무를 보다 쉽게 관찰할 수 있어 본 연구에서 기질로 선택하였다.

재료 및 방법

실험재료

Interesterification 반응에 사용된 기질인 카놀라유(canola oil)는 Wesson (ConAgra Foods, Inc., Omaha, NE, USA), palmitic ethyl ester (PEE, 16:0)와 stearic ethyl ester (StEE, 18:0)는 (주) 네오메가(Daejeon, Korea)에서 제공받아서 사용하였다. 고정화 (immobilization)에 사용한 lipase는 5종으로써 lipase AK (from *Pseudomonas fluorescens*), AY (from *Candida rugosa*), AH (from *Burkholderia cepacia*), PS (from *Burkholderia cepacia*), R (from *Penicillium roqueforti*)이며 이들은 Amano Enzyme Inc. (Nagoya, Japan)에서 제공받았다. 고정화에 사용한 support는 Amberlite[®]XAD[®]7 HP Resin으로 Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였으며 기기분석에 사 용된 모든 시약은 분석용 특급시약을 사용하였다.

효소 고정화

Zhang 등(2)이 보고한 전처리 방법을 이용하여 support인 Amberlite[®]XAD[®]7 HP Resin 350 mg을 6 mL의 ethanol에 20분 간 침지 후, 2-3번 distilled water를 이용하여 수세시켰으며, 이를 밤새 후드에 방치하여 건조한 후 고정화 support로 이용하였다. 고정화 방법은 Zhang 등(2)이 연구한 방법을 일부 변형하여 사 용하였으며 전처리를 시킨 support 200 mg을 2 mL의 lipase solution과 혼합시켰다. 이 때 lipase solution은 각 효소의 단백질 함량에 따라 11.2 mg protein/mL로 제조하였으며 0.01 M tris-HCl buffer (pH 8.6)를 사용하였다. 혼합 후 상온(25℃)에서 185 rpm 으로 17시간 동안 반응시켰으며 이 반응물을 1분간 3,000 rpm으 로 원심분리 하였다. 그 후 상층은 단백질 함량 측정에 이용하였 으며 support층은 buffer로 여러 번 수세하여 건조시킨 후 고정화 효소로 사용하였다. 이 때 수분을 제어하기 위해 데시케이터에 보관하였으며 이로써 water activity가 0.13-0.19의 범위를 나타내 는 고정화된 immobilized lipase AK, AY, AH, PS와 R을 준비하 였다.

단백질 함량 측정

Lowry 등(17)의 방법을 일부 변형하여 단백질 함량 측정 시에 이용하였으며 bovine serum albumin (BSA)을 standard로 이용하여 각각의 고정화 전 free lipase와 고정화한 후 상층에 대한 단 백질 함량을 측정하였다. 이를 이용하여 support에 흡착된 bounding protein(%)과 mg protein/g support를 계산하였다. 단백질 함량을 측정하기 위하여 용액 A (CuSO₄·5H₂O 0.5 g+Na₃C₆H₅O₇·2H₂O 1 g +distilled water 100 mL) 1 mL과 용액 B (Na₂CO₃ 20 g+NaOH 4 g +distilled water 100 mL) 50 mL을 혼합하여 용액 C를 제조하였으 며 용액 D는 Folin-Ciocalteu phenol 10 mL과 distilled water 10 mL을 혼합하여 제조하였다. 희석한 lipase solution을 1 mL 취하여 test tube에 넣고 용액 C를 2.5 mL 넣어 10분간 상온에서 방치한 후 용액 D를 0.25 mL 첨가하여 30분간 상온에서 방치시킨 후 spectrophotometer (UV-1700, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용 하여 562 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Free lipase를 이용한 batch type interesterification 반응

고정화 전 free lipase의 반응 특성을 알아보기 위해 50 mL vial 에 카놀라유, PEE와 StEE를 1:1:1의 몰 비율로 총 10 g이 되도 록 설정하였으며 5종의 효소는 총 기질무게의 10%인 1 g을 첨 가하여 반응을 진행하였다. 이 때 반응 조건은 46°C, 200 rpm으 로 laboratory stirrer/hot plate (Corning, PC-420, Oklahoma City, OK, USA)와 항온수조(WBC 1506D, Jeio-tech, Daejeon, Korea)를 이용하였다. 1, 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72시간별로 반응물을 취하였으며 이를 분석에 사용하였다.

Immobilized lipase를 이용한 batch type interesterification 반응

Immobilized lipase의 반응 특성을 알아보기 위하여 interesterification 반응을 수행하였다. 사용된 효소는 5종의 immobilized lipase (AK, AY, AH, PS와 R)를 이용하였으며 반응은 shaking heating bath (BS-21, Lab Companion, Daejeon, Korea)에서 진행하였다. 1, 3, 9, 48 시간별로 반응물을 취하여 분석에 이용하였으며 그 외의 반응 조건은 free lipase를 이용한 interesterification 반응 조 건과 동일하였다.

Immobilized lipase를 이용한 continuous type interesterification 반응

고정화된 효소 5종 중에서 batch type interesterification 반응 시 에 활성이 가장 높았던 immobilized lipase AK를 이용하여 continuous type interesterification 반응을 수행하였다. 반응기는 waterjacketed glass column (1 cm i.d. × 37.5 cm)에 12.02 g의 immobilized lipase AK와 25.33 g의 glass bead (6호)를 혼합 패킹하고 column에 silicone tubing을 연결한 후에 peristaltic tubing pump (EYELA, MP-1000-H, Tokyo, Japan)를 연결하였다. 이 때 glass column내 부피는 29.4 mL이었으며 void volume은 15.5 mL이였 다. 카놀라유, PEE와 StEE를 1:1:1의 몰 비율로 혼합한 후 46℃ 에서 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 g/min의 유속으로 합성하였으며 이 반응 물을 분석에 이용하였다.

반응에 따른 반응물의 Triacylglycerol의 지방산 조성 분석

지방산 조성은 gas chromatography (GC)를 이용하여 분석하였 다. 반응물 50 μL를 chloroform 200 μL에 희석하여 thin layer chromatograph (TLC, 20×20 cm, Merck, Darmstadt, Germany)에 spotting 하였으며 전개 용매는 petroleum ether:diethyl ether:acetic acid=90:10:1 (v/v/v)를 사용하여 전개한 후 TAG band만을 분리하 였다. 분리한 TAG band는 methylation 후 GC 분석에 사용하였다. Methylation은 분리한 TAG band를 test tube에 0.5 N NaOH methanol용액 1.5 mL과 함께 넣어 1분간 진탕 후 100℃에서 5분 간 반응시킨 다음 20°C에서 냉각하였다. 그 후 BF,-methanol 용 액 2 mL을 첨가하여 1분간 진탕시켜 100°C에서 3분간 반응 후 다시 20°C에서 냉각하였다. 냉각된 시료에 2 mL의 iso-octane과 1 mL의 포화 NaCl 용액을 첨가하여 1분간 진탕한 후 원심분리 를 이용하여 층을 분리하였다. 수분과 불순물을 제거하기 위하여 sodium sulfate anhydrous column을 이용하였으며 이를 농축시켜 지방산 조성을 분석하였다(18). 분석에 이용한 기기는 GC (YL6100GC, 6000series, Younglin, Anyang, Korea)이며 flame ionized detector (FID)를 이용하였다. 이때 detector의 온도는 260°C, injector의 온도는 250°C로 설정하였으며 column은 SP[™]-2560 (100 m×0.25 mm I.d×0.2 μm film thickness, Supelco, Bellofonte, PA, USA)을 사용하여 분석하였다. Oven의 초기 온도는

150°C이며 이를 5분간 유지시킨 후 4°C/min으로 220°C까지 승은 시켜 30분간 이 온도를 유지하였다. Carrier gas는 He을 사용하였 으며 1 mL/min으로 유지시키고 시료 1 μL를 GC에 주입하여 지 방산 조성을 분석하였다.

지방산의 위치별 조성 분석

Pancreatic lipase (from hog pancreas, Sigma Chemical Co.)를 이용하여 가수분해한 후 triacylglycerol 분자의 위치(sn-2, sn-1.3) 에 따른 지방산 조성을 분석하였다. 반응물 10 mg에 1 M Tris-HCl buffer (pH 7.6) 7 mL을 혼합한 후 0.05% bile salt 1.75 mL, 2.2% CaCl, 0.7 mL을 첨가하였다. 또한, pancreatic lipase 10 mg을 첨가하여 1분간 진탕한 후 37℃ 항온수조에서 3분간 반 응하였다. 그 다음 30초 간 진탕하여 3분간 반응, 30초간 진탕하 여 2분간 반응을 진행하였다. 그 후 4 mL의 diethyl ether를 첨가 하여 진탕한 후 원심분리를 이용하여 위층을 분리한 후 sodium sulfate anhydrous column을 이용하여 수분 및 불순물을 제거하였 다. 이를 TLC에 spotting 하여 전개용매 hexane:diethyl ether:acetic acid=50:50:1 (v/v/v)를 사용하여 전개 시킨 뒤 2-monoacylglycerol (MAG) band만을 분리하였다. 분리한 MAG band는 BF₃-methanol 을 이용하여 methylation시킨 후 GC분석을 시행하여 sn-2 위치의 지방산 조성을 분석하였다(19). 이 sn-2위치의 지방산 조성과 triacylglycerol의 지방산 조성을 이용하여 sn-1.3 위치의 지방산 조 성을 계산하였으며 계산식은 다음과 같다(8).

 $sn-1,3(\%) = [(3 \times fatty acid composition of TAG) - fatty acid composition of <math>sn-2]/2$

Reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC)를 통한 TAG 분석

반응물의 TAG 조성을 알아보기 위하여 RP-HPLC (Younglin, Anyang, Korea)를 이용하였다. 분석에 사용된 HPLC는 영린 SP930D 듀얼 램프와 Sedex 75 evaporative light scattering detector (Alfortvill, France)가 장착되어 있었다. 이동상은 기울기 용리를 이용하였으며 용매 A (acetonitrile)와 용매 B (isopropanol:hexane =2:1, v/v)를 유속 1 mL/min으로 흘려주었고 column은 Nova-pak C18 column (4 µm, 150×3.9 mm I.D., Waters, Milford, Ireland)를 사용하였다. 합성된 시료를 chloroform에 녹여 3 mg/mL이 되도록 제조하여 이용하였다. 분석이 시작되면 용매 A와 B를 부피비 80:20 비율로 흘리기 시작하여 45분까지 54:46으로 변화시킨 뒤 15분간 유지시킨 후 부피비를 80:20으로 65분까지 변화시켰다. 마 지막으로 70분까지 이를 유지함으로써 분석을 마쳤다(18). TAG 의 조성은 retention time (RT)와 partition number (PN) 사이의 관계식을 통하여 분석하였으며 계산식 중 CN은 TG의 전체 탄 소수를 의미하며 ND는 총 이중결합의 수를 뜻한다(19).

Partition number (PN) = Total number of carbons (CN)-2 \times total number of double bonds (ND)

Immobilized lipase의 reusability 측정

Immobilized lipase의 재사용 가능성을 확인하기 위하여 50 mL vial에 카놀라유, PEE와 StEE를 1:1:1의 몰 비율로 1 g의 기질 혼 합물과 각각의 immobilized lipase를 0.1 g (총 기질 무게의 10%) 를 혼합하여 반응을 하였다. 이 때 반응 조건은 46℃, 185 rpm으 로 9시간 동안 항온교반수조에서 진행하였다. 반응이 끝난 반응 물들을 회수한 후 3 mL의 hexane을 이용하여 사용된 고정화 효

소를 2번 세척하여 후드에서 건조시킨 다음 다시 반응을 진행하 였으며 이를 6번까지 수행하였다. 이 후 각 반응회수별 TAG의 총 포화지방산 함량을 1회 반응물의 총 포화지방산 함량에 대하 여 상대적 잔존율을 구하였다.

통계처리

통계처리는 SAS (statistical analysis system, version 9.2)를 실 시하여 Duncan's multiple range test를 진행하였으며 각 그룹간의 유의적인 차이를 *p*<0.05 수준에서 검증하였다.

결과 및 고찰

고정화된 단백질 함량 비교

고정화 전 free lipase의 단백질 함량 및 고정화 후 support에 흡착된 단백질 함량(bounding protein)과 g support당 흡착된 protein (mg protein/g support)을 Table 1에 나타내었다. Free lipase의 단백질 함량은 free lipase AH가 11.41%로 가장 높았던 반면, free lipase R이 2.22%로 가장 낮게 나타났다. Yang과 Rhee(20)의 경 우 resin인 Amberlite XAD 7을 이용하여 효소를 고정화 시킬 경 우 56%의 protein이 흡착되었으며 Mustranta 등(25)은 resin을 고 정화 support로 이용하였을 경우 silica gel이나 polyethylene보다 g 당 support에 흡착된 protein의 함량(mg)이 더 많았다고 보고하였 다. Table 1에서 보듯이 immobilized lipase에 고정화된 단백질 함 량은 0.03-0.14 mg protein/g support의 범위에서 나타났으며 free lipase에서 단백질 함량이 높았던 lipase AH, PS와 AK가 고정화 된 후에도 단백질의 함량(0.11-0.14 mg protein/g support)이 immobilized lipase AY와 R (0.03-0.05 mg protein/g support)보다 높았 다. 한편, bounding protein(%)의 경우 immobilized lipase AK가 63.91%로 가장 높아 support와의 친화(suitability)가 가장 뛰어났 으나, 단백질 함량이 가장 높았던 free lipase AH를 고정화한 immobilized lipase AH의 bounding protein(%)은 36.31%로써 가 장 낮게 나타났다.

Free lipase를 이용한 batch type interesterification 반응물 의 지방산 및 TAG 조성

반응 기질로 사용된 카놀라유의 주요 지방산은 oleic acid (C_{18:1}) 로써 58.81 area%의 가장 높은 조성을 나타났으며 포화지방산인 palmitic acid (C_{16:0})와 stearic acid (C_{18:0})는 각각 5.97와 2.41 area%이었다(Table 2). 한편, 5종의 free lipase와 기질(카놀라유, PEE, StEE)을 이용한 batch type interesterification 반응물의 지방 산 조성 변화를 Fig. 1에 나타내었다. Fig. 1(A)는 총 불포화지방

Table 1. Comparison of protein content (%) on free and immobilized lipases

	Free lipse	Immobilized lipase						
	protein content (%)	Bounding protein (%)	mg protein /g support					
AH	11.41±0.16 ^a	36.31±0.67°	$0.12{\pm}0.00^{b}$					
PS	7.76 ± 0.02^{b}	48.36±0.65 ^b	$0.11 \pm 0.00^{\circ}$					
AK	7.57 ± 0.08^{b}	63.91±0.29ª	$0.14{\pm}0.00^{a}$					
AY	$2.80{\pm}0.18^{d}$	38.98±6.52°	0.03±0.01e					
R	2.22 ± 0.00^{e}	49.81 ± 0.80^{b}	$0.05{\pm}0.00^{d}$					

All values are mean \pm SD (n=2).

^{a-e}Values with different superscript letter within the same row are significantly different by Duncan's multiple range test (p<0.05).

Table 2. Fatty acid composition (area%) of canola oil and interesterification products obtained from continuous type reactor at the different flow rate

	Canola oil			Immobilized lipase AK											
Fatty acid (area%)	TAG sn-2			TAG					sn-2				sn-	-1.3	
		sn-2	sn-1.3	0.6 g/min	0.8 g/min	1.0 g/min	1.2 g/min	0.6 g/min	0.8 g/min	1.0 g/min	1.2 g/min	0.6 g/min	0.8 g/min	1.0 g/min	1.2 g/min
16:0	5.97 ±0.55	1.35 ±1.04	8.28 ±1.35	13.66 ±0.14 ^a	9.75 ±0.01 ^b	9.00 ±0.19 ^c	$\begin{array}{c} 8.50 \\ \pm 0.16^{\rm d} \end{array}$	8.39 ±0.18ª	4.91 ±1.19 ^b	$^{\rm 4.07}_{\pm 0.31^{\rm b}}$	$\begin{array}{c} 3.19 \\ \pm 0.37^{\text{b}} \end{array}$	16.30 ± 0.30^{a}	12.17 ±0.57 ^b	11.46 ±0.13 ^{b,c}	11.15 ±0.06°
18:0	2.41 ±0.01	$\begin{array}{c} 0.80 \\ \pm 0.61 \end{array}$	3.22 ±0.28	6.77 ±0.12 ^a	$\begin{array}{c} 4.13 \\ \pm 0.04^{\text{b}} \end{array}$	3.60 ±0.31°	3.46 ±0.06 ^c	4.17 ± 0.08^{a}	2.74 ±0.47 ^b	${}^{1.92}_{\pm 0.59^{b,c}}$	1.56 ±0.02°	8.07 ±0.14ª	${}^{+.82}_{\pm 0.29^{b}}$	$4.44 \pm 0.76^{\rm b}$	$\begin{array}{c} 4.41 \\ \pm 0.07^{\text{b}} \end{array}$
18:1	58.81 ±2.52	51.53 ±1.74	62.45 ±4.65	53.38 ±0.06°	$\begin{array}{c} 54.82 \\ \pm 0.08^{\text{b}} \end{array}$	${55.33 \atop \pm 0.03^{a}}$	55.56 ± 0.16^{a}	58.33 ± 1.36^{a}	56.04 ±2.45ª	55.84 ± 0.06^{a}	56.63 ± 0.50^{a}	$50.91 \pm 0.60^{\text{b}}$	54.21 ±1.10ª	$55.08 \pm 0.07^{ m a}$	${55.02 \atop \pm 0.49^{a}}$
18:2	22.78 ±1.24	33.44 ±1.95	17.44 ±0.88	19.17 ± 0.18^{d}	22.21 ±0.08°	22.62 ± 0.16^{b}	$\begin{array}{c} 23.02 \\ \pm 0.07^{a} \end{array}$	21.90 ± 1.15^{b}	25.26 ± 1.69^{a}	28.12 ±0.81ª	26.93 ± 0.92^{a}	$17.80 \pm 0.84^{\rm b}$	20.68 ± 0.73^{a}	19.86 ±0.65ª	$\begin{array}{c} 21.07 \\ \pm 0.57^a \end{array}$
18:3	$\begin{array}{c} 10.04 \\ \pm 0.74 \end{array}$	12.88 ±2.05	8.62 ±2.13	7.04 ± 0.26^{b}	9.11 ± 0.05^{a}	$\begin{array}{c} 9.46 \\ \pm 0.00^{a} \end{array}$	9.47 ± 0.18^{a}	7.23 ±0.04 ^c	$^{11.06}_{\pm 0.04^{a,b}}$	$10.05 \pm 0.16^{\rm b}$	11.71 ±0.78 ^a	6.94 ±0.41°	$\begin{array}{c} 8.13 \\ \pm 0.10^{\text{b}} \end{array}$	9.17 ± 0.08^{a}	8.35 ± 0.11^{b}
$\Sigma USFA^{1)}$	91.63	97.85	88.51	79.58	86.13	87.40	88.05	87.45	92.36	94.01	95.27	75.65	83.02	84.10	84.44
ΣSFA^{2}	8.38	2.15	11.50	20.42	13.87	12.60	12.95	12.55	7.64	5.99	4.73	24.35	16.98	15.90	15.56

All values are mean±SD (n=2). ¹⁾Total unsaturated fatty acid.

²⁾Total saturated fatty acid.

a-dValues with different superscript letter within the same column are significantly different by Duncan's multiple range test (p < 0.05).



Fig. 1. Comparison of fatty acid composition (area%) in interesterification products obtained from batch type reactor at the different reaction time (A) total unsaturated fatty acid; (B) total saturated fatty acid.

산의 합[oleic, linoleic acid (C_{18:2}), linolenic acid (C_{18:3}))을 나타낸 것으로 대부분 free lipase와의 반응에서 반응 시간이 길어짐에 따 라 감소하는 경향을 보였으나 Fig. 1(B)은 총 포화지방산의 합 (palmitic acid, stearic acid)으로 반응 시간이 지남에 따라 증가하 는 경향을 보였다. 반응 기질로 포화지방산의 ethyl ester인 PEE 와 StEE를 사용하여 interesterificaton 반응을 진행하였으며 lipase 의 활성이 높을수록 반응물의 포화지방산(palmitic acid, stearic acid)의 조성 비율이 높아지는 것으로 보인다. 따라서 단백질 함 량이 가장 높았던 free lipase AH (Table 1)가 PEE와 StEE의 포 화 acyl기를 카놀라유의 TAG 분자들에 결합시키는 interesterification 반응을 가장 높게 수행하였음을 보여주었다. 반면, 단백질 함 량이 가장 낮았던 free lipase R (2.22%)의 경우 시간이 지남에도 총 포화지방산과 총 불포화지방산의 함량이 기질인 카놀라유와 비슷한 범위를 보이는 것으로 보아 interesterification 반응이 거의 일어나지 않았다고 판단된다. 반면, free lipase AY의 경우에는 단 백질 함량이 2.80%로써 단백질 함량은 낮았지만 반응시간이 길 어짐에 따라 총 포화지방산이 증가하는 것으로 나타나 lipase R 은 본 실험 조건에서의 interesterification 반응성이 상대적으로 매 우 낮은 것으로 판단된다. 한편, 5종의 free lipase 중에서 단백질 함량이 높았던 free lipase AH, PS와 AK는 72시간 반응물에서 35-40 area%의 총 포화지방산의 함량을 보여 반응 기질로 사용 된 카놀라유의 총 포화지방산의 함량인 8.38 area%보다 크게 증 가되는 것으로 나타나 free lipase AH, PS 및 AK가 PEE와 StEE 를 interesterification 반응에 사용한 것으로 판단된다. 이와 같이 lipase를 사용하여 TAG의 지방산 조성을 변형시킨 재구성 지질 을 제조하여 본래 유지가 갖고 있는 물리, 화학적 특성을 변화시 키는 연구가 1970년대부터 진행되고 있음을 Rousseau와 Marangoni (21)가 설명하고 있다.

한편, free lipase AK를 선택하여 이를 이용한 interesterification 반응 시간별 TAG species를 RP-HPLC를 이용하여 분석하였다(Fig. 2). 카놀라유의 TAG 조성(Table 3)은 triolein (OOO)이 57.49 area%로 가장 높은 비율로 나타났으며, 그 다음으로 1-linolenoly -2,3-dioleolyglycerol (LOO)이 33.77 area%이었고, 1-palmitiyl-2,3dioleolyglycerol (POO) 및 LPO/LOP 등이 존재하였다. 이러한 조 성은 반응 시간이 길어질수록 카놀라유의 주요 TAG species인 000와 LOO의 함량이 감소하였는데, 특히 000의 경우 72시간 반응물에서 6.53 area%를 보이면서 크게 감소하였으며 LOO도 4.60 area%로 감소하였다. 반면, 포화 지방산인 palmitic acid와



Fig. 2. Change of triacylglycerol (TAG) species in interesterification product obtained from batch type reactor with free lipase AK (TAG species: L=linoleic acid, O=oleic acid, P=palmitic acid, S=stearic acid).

stearic acid를 함유한 TAG species들의 함량이 증가하는 경향을 보여 POO의 함량이 26.06 area%로 증가하였으며, 1-stearoyl-2,3dioleolyglycerol (SOO)도 12.94 area%로 증가하였다.

Immobilized lipase와 batch type reactor를 통한 interesterification 반응물의 지방산 조성

제조한 5종의 고정화 효소와 반응기질을 이용하여 batch type reactor에서 interesterification을 진행하였으며 여기서 얻은 반응물 들의 위치별 지방산 조성 분석 결과는 Table 4와 같다. 고정화된 각 효소별 특성을 비교한 결과, 고정화된 immobilized lipase AK, AH와 PS의 경우 반응시간이 1시간에서 48시간으로 증가함에 따 라 총 지방산 함량 중 불포화지방산의 함량(ΣUSFA)은 감소하였 으며 포화지방산의 함량(ΣSFA)이 증가하였다. 48시간 반응물에 서의 palmitic acid와 stearic acid의 함량은 immobilized lipase AK가 20.79와 17.51 area%, immobilized lipase PS가 12.35와 7.30 area%, 그리고 immobilized lipase AH가 10.55와 5.49 area% 순으로 나타났다. 이는 기질로 사용된 카놀라유의 palmitic acid와 stearic acid의 함량이 각각 5.97과 2.41 area%으로 총 포화지방산 의 조성은 8.38 area%이었으며 반응시간이 증가함에 따라 interesterification의 기질로 사용된 PEE와 StEE가 반응 중 카놀라유의 TAG분자 안에 결합되어 총 포화지방산의 조성이 증가되었다는 것을 의미한다. 48시간 반응을 비교해보면 immobilized lipase AK 가 38.3 area%의 총 포화지방산 함량을 보이면서 가장 높은 활

성을 보였다. 이를 free lipase AH, AK 및 PS와 비교하여 interesterification의 반응성을 살펴보면, 고정화를 함에 따라 lipase의 활성이 감소하는 것을 볼 수 있었으며 이는 Kartal 등(22)이 Candida rugosa에서 유래된 lipase의 고정화 전과 후의 활성을 비 교한 연구와 같은 결과를 나타내었다. 이와 같이 lipase를 고정화 할 경우 효소의 활성에 변화가 생기며 Bloomer 등(23)은 고정화 에 사용하는 support의 종류에 따라 효소의 활성에 큰 영향을 미 친다고 보고하였다. 반면, immobilized lipase AY와 immobilized lipase R의 경우 총 지방산 함량에서 반응 시간에 따라 포화지방 산 함량이 7.55-8.93 area%와 7.46-7.71 area% 범위로 보이면서 반응 전 카놀라유의 총 포화지방산 조성과 큰 차이가 없어 immobilized lipase AY와 R의 interesterification 반응성은 거의 없 는 것으로 판단된다. 한편, sn-2 위치의 지방산 조성에서는 immobilized lipase AK의 경우 반응시간이 1시간에서 48시간으로 증가 할수록 palmitic acid와 stearic acid의 함량이 3.62-23.68 area%와 1.39-19.11 area% 범위를 보이면서 급격히 증가하였다. 이는 반응 시간이 길어집에 따라 sn-1,3 위치의 지방산들이 sn-2위치로 이동 하는 acyl migration 현상이 일어났으며 또한, 반응에 사용된 immobilized lipase AK의 반응 위치 특이성이 크지 않았기 때문 으로 판단된다.

Immobilized lipase와 continuous type reactor를 통한 interesterification 반응물의 지방산 및 TAG 조성

Immobilized lipase 중 위치적 특이성은 크지 않았지만 활성이 높았던 immobilized lipase AK를 scale-up 제조하여 continuous type reactor로 interesterification 반응을 수행할 때 유속의 변화가 반응물의 지방산 조성 변화에 미치는 영향을 살펴보았다(Table 2). 유속을 0.6, 0.8, 1.0 및 1.2 g/min으로 증가시키며 얻은 interesterification 반응물의 총 포화지방산 함량은 각각 20.42, 13.87, 12.60와 12.95 area%로 감소하였다. 이는 반응기질의 유속이 느 릴수록 효소와 기질의 접촉하는 시간이 길어지므로 반응을 할 수 있는 시간이 증가함에 따라 interesterification 반응이 증가하고 따 라서 반응물의 총 포화지방산의 조성이 증가하는 것으로 판단된 다. 또한, 반응물을 구성하고 있는 TAG 분자들의 sn-2위치 지방 산 조성은 반응 유속이 증가할수록 총 포화 지방산의 함량이 12.55 area% (0.6 g/min)에서 4.73 area% (1.2 g/min)로 감소하였다. 이와 같은 반응물의 지방산조성 변화로 인한 TAG 분자들의 조 성변화를 알아보기 위하여 RP-HPLC를 이용하여 결과를 제시하 였다(Table 3). Continuous type reactor를 이용한 반응물의 TAG 분자 조성은 유속을 0.6에서 1.2 g/min로 점차 증가시킬 경우 OOO

Table 3. Peaks classified by partition number (PN) of canola oil and interesterification products obtained from continuous type reactor at the different flow rate

	TAG species	Canala oil	Immobilized lipase AK							
	TAO species	Canola oli	0.6 g/min	0.8 g/min	1.0 g/min	1.2 g/min				
DN-4C	LOO	33.77±0.97	26.04±0.39	32.12±0.02	34.15±0.33	34.73±0.25				
FIN-40	LPO/LOP	3.68±0.33	8.58±0.23	5.11±0.09	4.65±0.25	4.91±0.52				
	000	57.49±0.13	40.37±0.69	49.08±0.15	51.05±0.25	50.28±0.27				
PN=48	POO	5.06±0.51	16.89±0.71	10.43 ± 0.29	8.05 ± 0.01	8.31±0.50				
	PPO/POP	-	-	-	-	-				
	SOO	-	6.44±0.36	2.78±0.24	2.12±0.17	1.79±0.00				
PN=50	PSO/POS	-	1.70 ± 0.22	0.36 ± 0.05	-	-				
	PPS	-	-	-	-	-				

All values are mean±SD (n=2). TAG species: L=linoleic acid, O=oleic acid, P=palmitic acid, S=stearic acid.

(triolein)의 함량이 각각 40.37, 49.08, 51.05 및 50.28 area%로 증 가하는 경향을 보인 반면, POO (1-palmitiyl-2,3-dioleolyglycerol)의 함량은 16.89, 10.43, 8.05 및 8.31 area%로 감소하였는데 이는 펌 프의 유속이 감소함에 따라 기질과의 접촉 시간이 길어지고 반 응할 시간이 증가하여 반응기질인 카놀라유의 주요 TAG분자인 OOO의 조성은 적어지면서 StEE와 PEE가 interesterification반응에 참여하여 POO와 SOO 등의 조성이 증가하는 것으로 판단된다. 이와 같이 da Silva 등(24)도 연속식 반응기를 이용하여 재구성지 질의 합성 연구를 할 때에는 유속이 가장 중요한 요인이라 하였 으며 이를 증가시킴에 따라 기질과 효소의 반응 시간이 감소한 다고 보고하였다. 한편, batch type reactor를 이용한 반응물에는 PPO/POP, SSO/SOS 및 소량의 PPS와 SSP가 존재하였지만 con-

Table 4. Fatty acid composition (area %) of interesterification products obtained from batch type reactor with different immobilized lipases and reaction times

T • 1	Immobilized lipase AH												
Fatty acid (area%)		TA	AG			sn	-2			sn-1.3			
(1104/0)	1 h	3 h	9 h	48 h	1 h	3 h	9 h	48 h	1 h	3 h	9 h	48 h	
16:0	4.72 ± 0.03^{d}	5.13 ±0.03°	12.52 ±0.03 ^a	10.55 ± 0.05^{b}	6.92 ± 0.04^{a}	$\begin{array}{c} 1.01 \\ \pm 0.07^{\text{d}} \end{array}$	1.39 ±0.07 ^c	3.19 ±0.03 ^b	3.62 ± 0.02^{d}	7.19 ±0.08°	$18.09 \\ \pm 0.00^{a}$	$14.23 \pm 0.06^{\text{b}}$	
18:0	2.38 ± 0.01^{d}	2.65 ±0.00°	5.43 ±0.00 ^b	5.49 ±0.01ª	1.62 ±0.03 ^a	$\begin{array}{c} 0.48 \\ \pm 0.03^{\text{d}} \end{array}$	0.87 ±0.03°	1.42 ±0.06 ^b	2.76 ± 0.00^{d}	3.74 ±0.02°	7.71 ±0.02ª	7.52 ±0.01 ^b	
18:1	66.26 ± 0.02^{a}	65.77 ±0.01 ^b	58.16 ± 0.05^{d}	59.10 ±0.14°	51.12 ±0.15 ^b	55.40 ± 0.18^{a}	55.15 ±0.22ª	55.23 ± 0.87^{a}	73.83 ±0.10 ^a	70.95 ±0.11 ^b	59.67 ±0.19 ^d	61.04 ±0.65°	
18:2	19.00 ± 0.03^{a}	18.88 ± 0.01^{b}	17.05 ± 0.04^{d}	17.49 ±0.01°	$29.00 \\ \pm 0.03^{\rm b}$	31.41 ±0.14 ^a	30.76 ±0.31 ^a	29.19 ±0.54 ^b	14.00 ± 0.06^{a}	12.61 ±0.09 ^b	10.19 ± 0.22^{d}	11.64 ±0.26°	
18:3	7.64 ±0.02ª	7.57 ± 0.03^{a}	6.84 ±0.03°	$7.37 \pm 0.08^{\rm b}$	$11.34 \pm 0.06^{a,b}$	11.69 ±0.08ª	11.69 ±0.03ª	10.98 ± 0.41^{b}	5.79 ± 0.05^{a}	$\begin{array}{c} 5.51 \\ \pm 0.08^{a} \end{array}$	$4.41 \pm 0.06^{\text{b}}$	5.57 ±0.33ª	
ΣUSFA	92.90	92.22	82.05	83.96	91.45	98.50	97.59	95.39	93.62	89.08	74.28	78.25	
ΣSFA	7.10	7.78	17.95	16.04	8.55	1.50	2.26	4.61	6.38	10.92	25.79	21.75	

	Immobilized lipase AK											
Fatty acid (area%)		TA	AG			sr	i- 2		sn-1.3			
(1 h	3 h	9 h	48 h	1 h	3 h	9 h	48 h	1 h	3 h	9 h	48 h
16:0	$\begin{array}{c} 5.64 \\ \pm 0.08^{\text{d}} \end{array}$	7.46 ±0.05°	11.65 ±0.09 ^b	20.79 ± 0.09^{a}	3.62 ± 0.01^{d}	8.16 ±0.00°	12.50 ±0.17 ^b	23.68 ± 0.43^{a}	6.65 ±0.11°	7.11 ±0.08°	11.23 ±0.21 ^b	19.35 ±0.35ª
18:0	2.91 ± 0.03^{d}	3.80 ±0.02 ^c	${6.43} \pm 0.00^{\rm b}$	17.51 ±0.06 ^a	$1.39 \pm 0.17^{\rm d}$	2.98 ±0.15°	$5.60 \pm 0.15^{\rm b}$	19.11 ± 0.70^{a}	$\begin{array}{c} 3.67 \\ \pm 0.04^{d} \end{array}$	4.21 ±0.10 ^c	$\begin{array}{c} 6.84 \\ \pm 0.07^{\mathrm{b}} \end{array}$	16.71 ±0.25ª
18:1	65.23 ± 0.05^{a}	$63.64 \pm 0.06^{\rm b}$	59.79 ±0.10°	45.53 ± 0.05^{d}	55.12 ± 0.92^{a}	55.36 ±1.28ª	57.43 ± 1.06^{a}	42.06 ± 1.53^{b}	70.29 ± 0.53^{a}	${}^{67.78}_{\pm 0.73^{ m b}}$	60.97 ±0.67°	47.27 ± 0.84^{d}
18:2	18.66 ±0.04ª	17.85 ±0.04 ^b	15.70 ±0.01°	11.49 ±0.05 ^d	28.54 ±0.53ª	$\begin{array}{c} 23.85 \\ \pm 0.87^{\rm b} \end{array}$	17.64 ±0.51°	$10.99 \\ \pm 0.37^{\rm d}$	13.72 ±0.20 ^b	14.85 ±0.37ª	14.73 ±0.27ª	11.74 ±0.27°
18:3	$\begin{array}{c} 7.56 \\ \pm 0.04^a \end{array}$	7.25 ±0.03 ^b	6.43 ±0.00°	4.67 ± 0.03^{d}	11.32 ±0.23 ^a	$9.65 \pm 0.26^{\text{b}}$	6.82 ±0.23°	4.17 ± 0.03^{d}	5.68 ± 0.17^{b}	$\begin{array}{c} 6.06 \\ \pm 0.18^{\text{a,b}} \end{array}$	6.23 ±0.11ª	4.93 ±0.03°
ΣUSFA	91.45	88.74	81.92	61.70	94.98	88.86	81.90	57.21	89.68	88.69	81.93	63.94
ΣSFA	8.55	11.26	18.08	38.30	5.02	11.14	18.10	42.79	10.32	11.31	18.07	36.06

	Immobilized lipase AY												
Fatty acid (area%)		TA	١G			sn-2				sn-1.3			
	1 h	3 h	9 h	48 h	1 h	3 h	9 h	48 h	1 h	3 h	9 h	48 h	
16:0	$\begin{array}{c} 4.90 \\ \pm 0.00^{\text{d}} \end{array}$	5.06 ±0.01°	5.26 ±0.02 ^b	5.81 ±0.01 ^a	$\begin{array}{c} 0.82 \\ \pm 0.07^{\mathrm{b}} \end{array}$	1.62 ±0.18 ^a	$\begin{array}{c} 1.68 \\ \pm 0.08^{a} \end{array}$	1.84 ±0.06 ^a	6.93 ± 0.03^{b}	6.78 ±0.07 ^c	$^{7.05}_{\pm 0.01^{\rm b}}$	7.80 ± 0.02^{a}	
18:0	2.61 ±0.01 ^d	2.69 ±0.02 ^c	2.81 ±0.00 ^b	3.12 ±0.01 ^a	0.54 ± 0.12^{b}	0.75 ±0.09 ^b	1.14 ±0.02 ^a	1.14 ±0.15 ^a	3.64 ±0.07 ^b	$\begin{array}{c} 3.66 \\ \pm 0.07^{\text{b}} \end{array}$	$\begin{array}{c} 3.65 \\ \pm 0.01^{\text{b}} \end{array}$	4.11 ±0.06 ^a	
18:1	64.48 ± 0.06^{a}	64.45 ± 0.01^{a}	64.21 ±0.01 ^b	63.82 ±0.05°	53.36 ±0.73ª	53.78 ±0.11ª	53.34 ±0.21ª	53.30 ±0.11ª	70.04 ± 0.27^{a}	$69.79 \pm 0.07^{ m a}$	69.64 ± 0.09^{a}	69.08 ± 0.13^{b}	
18:2	20.26 ± 0.03^{a}	$\begin{array}{c} 20.18 \\ \pm 0.03^{a,b} \end{array}$	20.13 ±0.03 ^b	19.92 ±0.04°	$\begin{array}{c} 33.08 \\ \pm 0.23^{a} \end{array}$	32.12 ±0.15 ^b	32.39 ± 0.10^{b}	31.94 ±0.13 ^b	13.85 ±0.07°	14.21 ±0.03 ^a	$\begin{array}{c} 14.00 \\ \pm 0.00^{\text{b}} \end{array}$	13.91 ±0.00 ^{b,c}	
18:3	7.76 ± 0.03^{a}	7.62 ±0.01 ^b	$7.59 \pm 0.00^{\rm b}$	$7.33 \pm 0.00^{\circ}$	12.19 ±0.56ª	11.72 ±0.17 ^a	11.45 ±0.16 ^a	11.79 ± 0.15^{a}	5.54 ±0.24 ^a	$\begin{array}{c} 5.56 \\ \pm 0.09^{a} \end{array}$	5.66 ±0.09 ^a	$\begin{array}{c} 5.10 \\ \pm 0.08^{\mathrm{b}} \end{array}$	
ΣUSFA	92.49	92.25	91.93	91.07	98.64	97.62	97.18	97.02	89.42	89.56	89.30	88.09	
ΣSFA	7.55	7.75	8.07	8.93	1.36	2.38	2.82	2.98	10.58	10.44	10.70	11.91	

Table 4. Continued

	Immobilized lipase PS												
Fatty acid (area%)		TA	AG			sn	-2			sn-	1.3		
(4104/0)	1 h	3 h	9 h	48 h	1 h	3 h	9 h	48 h	1 h	3 h	9 h	48 h	
16:0	6.70 ±0.20 ^c	6.54 ±0.12 [°]	$8.01 \pm 0.00^{\text{b}}$	12.35 ±0.13 ^a	2.54 ±0.09 ^b	1.39 ±0.28°	1.43 ±0.00 ^c	5.46 ± 0.08^{a}	8.78 ±0.25 ^c	9.11 ±0.32°	11.31 ±0.00 ^b	15.80 ±0.16 ^a	
18:0	$\begin{array}{c} 3.06 \\ \pm 0.11^d \end{array}$	3.33 ±0.06°	4.32 ±0.04 ^b	7.30 ±0.11ª	1.43 ±0.14 ^c	4.61 ±0.07ª	$\begin{array}{c} 0.86 \\ \pm 0.03^{\text{d}} \end{array}$	2.39 ± 0.07^{b}	3.88 ±0.24 ^c	$\begin{array}{c} 2.69 \\ \pm 0.06^{\text{d}} \end{array}$	${6.05 \atop \pm 0.05^{b}}$	9.75 ±0.21ª	
18:1	63.61 ± 1.09^{a}	${}^{62.84}_{\pm 0.64^{a,b}}$	$61.55 \pm 0.30^{\text{b}}$	56.74 ±0.51°	54.13 ±0.22 ^b	52.67 ±0.13 ^c	55.63 ± 0.45^{a}	54.74 ±0.27 ^b	${68.35 \atop \pm 1.52^a}$	67.92 ± 1.03^{a}	64.51 ±0.67 ^b	57.74 ±0.63°	
18:2	18.99 ± 0.75^{a}	19.71 ±0.30ª	18.76 ±0.11 ^a	17.02 ± 0.10^{b}	${ 31.04 \atop \pm 0.40^{a} }$	30.26 ± 0.30^{a}	$\begin{array}{c} 30.68 \\ \pm 0.18^{a} \end{array}$	27.39 ±0.21 ^b	12.96 ±0.92 ^b	14.43 ±0.30 ^a	$12.80 \pm 0.07^{\rm b}$	$11.83 \pm 0.04^{\rm b}$	
18:3	7.64 ±0.03 ^a	7.59 ±0.16ª	7.36 ±0.23 ^a	6.59 ±0.16 ^b	$10.86 \pm 0.13^{a,b}$	11.07 ±0.22 ^a	11.41 ±0.60 ^a	${}^{10.02}_{\pm 0.04^{b}}$	6.03 ±0.11 ^a	$\begin{array}{c} 5.85 \\ \pm 0.35^{a,b} \end{array}$	$\begin{array}{c} 5.33 \\ \pm 0.65^{a,b} \end{array}$	$\begin{array}{c} 4.88 \\ \pm 0.22^{\text{b}} \end{array}$	
ΣUSFA	90.23	90.13	87.66	80.35	96.03	93.99	97.71	92.15	87.34	88.20	82.64	74.45	
ΣSFA	9.77	9.87	12.34	19.65	3.97	6.01	2.29	7.85	12.66	11.80	17.36	25.55	
	Immobilized lipase R												
Fatty acid (area%)		TAG				sn	-2			sn-1.3			
(1 h	3 h	9 h	48 h	1 h	3 h	9 h	48 h	1 h	3 h	9 h	48 h	
16:0	4.85 ±0.01°	5.00 ± 0.01^{a}	$\begin{array}{c} 4.89 \\ \pm 0.00^{\mathrm{b}} \end{array}$	$\begin{array}{c} 4.89 \\ \pm 0.00^{\mathrm{b}} \end{array}$	3.09 ± 0.02^{a}	$1.36 \pm 0.05^{\rm b}$	1.02 ±0.02°	$1.41 \pm 0.09^{\rm b}$	5.74 ±0.01°	$\begin{array}{c} 6.82 \\ \pm 0.03^a \end{array}$	$\begin{array}{c} 6.82 \\ \pm 0.00^{a} \end{array}$	${6.63 \atop \pm 0.04^{b}}$	
18:0	2.60 ±0.01°	2.70 ± 0.01^{a}	2.60 ±0.01 ^c	2.63 ± 0.00^{b}	2.02 ± 0.06^{a}	$\begin{array}{c} 0.87 \\ \pm 0.00^{\mathrm{b}} \end{array}$	0.48 ±0.03°	$\begin{array}{c} 0.80 \\ \pm 0.15^{\mathrm{b}} \end{array}$	2.90 ±0.01°	$3.62 \pm 0.01^{a,b}$	3.67 ± 0.00^{a}	$\begin{array}{c} 3.54 \\ \pm 0.08^{\text{b}} \end{array}$	
18:1	64.51 ± 0.00^{a}	${}^{64.44}_{\pm 0.06^{a,b}}$	${}^{64.40}_{\pm 0.09^{a,b}}$	${}^{64.40}_{\pm 0.02^{\mathrm{b}}}$	${ 52.48 \atop \pm 0.40^{b} }$	53.44 ± 0.20^{a}	53.49 ±0.15ª	$52.94 \pm 0.03^{a,b}$	70.52 ± 0.21^{a}	$69.94 \pm 0.00^{ m b}$	$69.86 \pm 0.22^{\text{b}}$	70.03 ± 0.01^{b}	
18:2	20.17 ± 0.02^{a}	20.10 ± 0.08^{a}	20.23 ± 0.09^{a}	20.26 ± 0.02^{a}	30.95 ± 0.01^{b}	32.28 ± 0.30^{a}	32.62 ±0.14ª	32.32 ± 0.28^{a}	14.79 ±0.04ª	$^{\rm 14.01}_{\pm 0.03^{\rm b}}$	$14.04 \pm 0.20^{\rm b}$	14.23 ±0.17 ^b	
18:3	$7.88 \pm 0.02^{\rm a}$	7.75 ±0.01 ^b	$\begin{array}{c} 7.88 \\ \pm 0.00^{a} \end{array}$	7.90 ±0.01 ^a	11.47 ±0.49 ^b	${}^{12.04}_{\pm 0.05^{a,b}}$	12.39 ± 0.02^{a}	12.54 ±0.07 ^a	$\begin{array}{c} 6.08 \\ \pm 0.28^{a} \end{array}$	5.60 ± 0.01^{b}	5.62 ±0.01 ^b	$5.58 \pm 0.04^{\text{b}}$	
ΣUSFA	92.56	92.29	92.51	92.49	94.90	97.77	98.50	97.79	91.39	89.56	89.52	89.84	
ΣSFA	7.46	7.71	7.49	7.51	5.10	2.23	1.50	2.21	8.63	10.44	10.48	10.16	

tinuous type reactor를 이용한 반응물에서는 나타나지 않았다.

Immobilized lipase reusability

제조된 immobilized lipase의 반복 반응 가능 여부를 확인하기 위해 9시간 반응을 6번 반복하여 나타내었다(Table 5). Immobilized lipase R과 AY는 앞의 결과에서 본 바와 같이 interesterification 반응이 크게 나타나지 않았으므로 이 실험에서 제외하였다. Immobilized lipase AK, AH와 PS 모두에서 두 번째 반복 반응 시에 첫 번째 반응 시보다 interesterification 정도가 120.9-196.5% 증가하였는데, 특히 immobilized lipase AH와 PS의 경우 두 번째

Table 5. Comparison of residual activity (%) according toreaction number of interesterification using immobilized lipases(AK, AH and PS)(Unit: %)

Reaction number	Immobilized AK	Immobilized AH	Immobilized PS
1 st	100	100	100
2^{nd}	120.9	181.0	196.5
3 rd	97.8	194.3	198.7
4^{th}	61.8	182.9	198.7
5 th	49.4	185.4	192.9
6 th	38.2	178.5	185.1

반응 이후부터 6회 반응 시까지 효소활성의 변화가 크게 나타나 지 않았다. 반면, immobilized lipase AK의 경우는 두 번째 반응 이후 점차 interesterification 반응이 감소하였으며 6회 반응 시에 는 첫 번째 반응 대비 약 38%까지 감소하였다. Mustranta 등(25) 과 Zaborsky(26)는 흡착법을 이용한 고정화 효소의 경우 효소와 support간의 bounding force가 약하여 반복 반응 시에 lipase가 탈 착되어 활성이 감소한다고 하였다. 따라서 bounding protein의 함 량이 가장 높았던 immobilized lipase AK (63.91%)의 경우 두 번 째 반응 후부터 활성이 감소하였는데 이는 support에 흡착되었던 free lipase AK가 탈착되어 나타난 것으로 생각된다. 반면, bounding protein이 48.36%이었던 immobilized lipase PS와 36.31%이었 던 immobilized lipase AH는 6번째까지 활성이 비교적 유지되는 것으로 나타났다.

요 약

본 연구는 미생물로부터 유래된 5종(AH, AK, AY, PS와 R)의 lipase들을 Amberlite XAD 7에 흡착법으로 고정화 시킨 후 각 immobilized lipase들의 특성을 알아보았다. 고정화 전과 후의 단 백질 함량 및 각 free lipase들과 immobilized lipase들을 이용한 interesterification 반응물의 지방산과 TAG 조성을 분석하였다. 또 한, immobilized lipase에 있어 중요한 요인인 reusability를 확인하

였다. Free lipase의 단백질 함량은 2.22-11.41%로 AH가 가장 높 았던 반면, immobilized lipase에서는 AH, PS와 AK가 mg protein/g support이 높았다. 한편, 반응 특성을 알아보기 위해 카놀 라유, PEE와 StEE를 기질로 하여 batch type interesterification을 진행하였을 때, free lipase의 경우 free lipase R을 제외한 다른 free lipase들은 반응시간이 1시간에서 72시간으로 증가함에 따라 총 포화지방산 함량이 증가하였으며 그 중 free lipase AH가 반 응성이 가장 높았다. 또한, RP-HPLC를 통해 free lipase AK 반 응물을 분석한 결과, 반응시간이 길어질수록 카놀라유(0시간)에 서 볼 수 있었던 57.49 area%의 OOO가 6.53 area%로 감소하였 다. 이는 각 free lipase들이 PEE와 StEE를 효소적 반응에 이용했 기 때문이라고 판단된다. 한편, immobilized lipase AY와 R의 경 우 반응시간이 1시간에서 48시간으로 증가하여도 카놀라유(0시간) 의 총 포화지방산 함량과 큰 차이가 없었으나 immobilized AK의 경우 48시간에서 38.3 area%의 포화지방산 함량으로 가장 높은 활성을 보였다. 또한, 이를 사용하여 continuous type으로 반응하 였을 때 유속이 느릴수록 효소와 기질 사이의 접촉 시간이 길어 져 반응물의 총 포화지방산 함량이 증가함을 알 수 있었다. Reusability는 immobilized AK, AH와 PS 모두에서 두 번째 반복 반응을 하였을 때, 첫 번째 반응보다 총 포화지방산이 120-196.5% 증가하였다. 그러나 bounding protein 함량이 가장 높았던 immobilized AK는 support에 흡착되었던 free lipase AK의 탈착이 일 어나 2번째 반응 후부터 활성이 감소한 반면, immobilized AH와 PS는 활성이 비교적 유지되었다.

감사의 글

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

References

- Kim JK, Park JK, Kim HK. Synthesis and characterization of nanoporous silica support for enzyme immobilization. Colloid. Surface. A 241: 113-117 (2004)
- Zhang L, Hellgren LI, Xu X. Immobilization of phospholipase C for the production of ceramide from sphingomyelin hydrolysis. J. Am. Oil Chem. Soc. 84: 237-247 (2007)
- Malcata FX, Reyes HR, Garcia HS, Hill Jr. CG, Amundson CH. Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases. Enzyme Microb. Tech. 14: 426-446 (1992)
- Ye P, Jiang J, Xu ZK. Adsorption and activity of lipase from *Candida rugosa* on the chitosan-modified poly (acrylonitrile-comaleic acid) membrane surface. Colloid. Surface. B. 60: 62-67 (2007)
- Wang Y, Caruso F. Mesoporous silica spheres as supports for enzyme immobilization and encapsulation. Chem. Mater. 17: 953-961 (2005)
- Bai YX, Li YF, Yang Y, Yi LX. Covalent immobilization of triacylglycerol lipase onto functionalized novel mesoporous silica supports. J. Biotechnol. 125: 574-582 (2006)
- Yu HW, Chen H, Wang X, Yang YY, Ching CB. Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) with controlled particles: Application to *Candida rugosa* lipase. J. Mol. Catal. B-Enzym. 43: 124-

127 (2006)

- 8. Lee KT, Akoh CC. Structured lipids: synthesis and applications. Food Rev. Int. 14: 17-34 (1998)
- Haas MJ, Scott K, Jun W, Janssen G. Enzymatic phosphatidylcholine hydrolysis in organic solvent: an examination of selected commercially available lipases. J. Am. Oil Chem. Soc. 71: 483-490 (1991)
- 10. Yesiloglu Y. Immobilized lipase-catalyzed ethanolysis of sunflower oil. J. Am. Oil Chem. Soc. 81: 157-160 (2004)
- Rosu R, Uozaki Y, Iwasaki Y, Yamane T. Repeated use of immobilized lipase for monoacylglycerol production by solid-phase glycerolysis of olive oil. J. Am. Oil. Chem. Soc. 74: 445-450 (1997)
- Magnin D, Dumitriu S, Magny P, Chornet E. Lipase immobilization into porous chitoxan beads: activities in aqueous and organic media and lipase localization. Biotechnol. Progr. 17: 734-741 (2001)
- Pereira EB, De Castro HF, De Moraes FF, Zanin GM. Kinetic studies of lipase from *Candida rugosa*: a comparative study between free and immobilized enzyme onto porous chitosan beads. Appl. Biochem. Biotech. 91: 739-752 (2001)
- Lee KT, Foglia TA, Lee JH. Low-calorie fat substitutes: synthesis and analysis. Vol. 16, pp. 1-19. In: Handbook of Industrial Biocatalysis. Hou CT (ed). CRC Press, Boca Raton, FL, USA (2005)
- Lee KT, Foglia TA. Synthesis, purification, and characterization of structured lipids produced from chicken fat. J. Am. Oil Chem. Soc. 77: 1027-1034 (2000)
- Cho EJ, Lee JH, Lee KT. Optimization of enzymatic synthesis condition of structured lipids by response surface methodology. Korean J. Food Sci. Technol. 36: 531-536 (2004)
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275 (1951)
- Moon JH, Lee JH, Shin JA, Hong ST, Lee KT. Optimization of lipase-catalyzed production of structured lipids from canola oil containing similar composition of triacylglycerols to cocoa butter. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 40: 1430-1437 (2011)
- Lee KT, Jones KC, Foglia TA. Separation of structured lipids by high performance liquid chromatography. Chromatographia 55: 197-201 (2002)
- Yang DS, Rhee JS. Continuous hydrolysis of olive oil by immobilized lipase in organic solvent. Biotechnol. Bioeng. 40: 748-752 (1992)
- Rousseau D, Marangoni AG. Tailoring the textural attributes of butter fat/canola oil blends via *Rhizopus arrhizus* lipase-catalyzed interesterification. 2. Modifications of physical properties. J. Agr. Food Chem. 46: 2375-2381 (1998)
- 22. Kartal F, Janssen MHA, Hollmann F, Sheldon RA, Kilinc A. Improved esterification activity of *Candida rugosa* lipase in organic solvent by immobilization as cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). J. Mol. Catal. B-Enzym. 71: 85-89 (2011)
- Bloomer S, Adlercreutz P, Mattiasson B. Triglyceride interesterification by lipases. 1. Cocoa butter equivalents from a fraction of palm oil. J. Am. Oil Chem. Soc. 67: 519-524 (1990)
- 24. da Silva RC, De Martini Soares FAS, Hazzan M, Capacla IR, Gonçalves MIA, Gioielli LA. Continuous enzymatic interesterification of lard and soybean oil blend: Effects of different flow rates on physical properties and acyl migration. J. Mol. Catal. B-Enzym. 76: 23-28 (2012)
- Mustranta A, Forssell P, Poutanen K. Applications of immobilized lipases to transesterification and esterification reactions in non-aqueous system. Enzyme Microb. Tech. 15: 133-139 (1993)
- 26. Zaborsky OR. Immobilized Enzyme. CRC Press, Boca Raton, FL, USA. pp. 75-123 (1973)