PEI(Polyethyleneimine)를 이용하여 음이온계 레진에 고정화된 Lipase AH 제조 및 효소적 Interesterification을 통한 반응 특성 연구

이치우 · 이기택
충남대학교 식품공학과

Immobilization of *Burkholderia cepacia* Lipase on Weak Base Styrene Resin Using Polyethyleneimine with Cross-linking

Chi Woo Lee and Ki Teak Lee

Dept. of Food Science and Technology, Chungnam National University

ABSTRACT This study assessed the effect of immobilized lipase on weak base styrene resin using polyethyleneimine (PEI) with cross-linking. Two procedures were used in this study. The first one, “mono-layer” lipase immobilization, involves washing PEI after adsorption. The second procedure, “multi-layer” lipase immobilization, has no washing before the cross-linking step. Treverlite XS-100200 (weak base styrene resin) was immersed with PEI solution (2.2 mg/mL). Lipase AH (from *Burkholderia cepacia*) was adsorbed onto the support coated with PEI before cross-linking with glutaraldehyde. Structured lipid was synthesized by immobilized lipase-catalyzed interesterification using canola oil, palmitic ethyl ester (PEE), and stearic ethyl ester (StEE). Total fatty acid contents of triacylglycerol (TAG) in structured lipids were analyzed to investigate activity, properties, and reusability of immobilized lipases. Activities of immobilized lipases on the multi-layer and mono-layer increased at a high concentration (8 mg/mL) of lipase solution used for immobilization. The results show that immobilized lipase with the mono-layer method at pH 8.0 on resin had the highest total saturated fatty acid content (26.17 area%). Activity of immobilized lipase with the multi-layer method at pH 7.5 on support was lower than that of the mono-layer, but total saturated fatty acid content was 16.79 area% higher than that of lipase AH (15.01 area%).

Key words: immobilization, lipase activity, interesterification, lipase AH

서 론

효소 고정화의 주된 이유는 단백질로 이루어진 효소를 사용할 때 불용성의 support에 효소를 부착시켜 물리, 화학적으로 안정성과 활성을 유지하려는 목적에 있다(1,2). 또한 효소를 사용 후 회수하여 재사용이 가능하고 그 활성이 유지되어 생산비가 절감되는 등 산업적으로 유용하게 사용할 수 있다(3). Lipase의 고정화에 관한 대부분의 연구들은 이미 30년 전부터 연구(4)되어 adsorption(5), encapsulation(6), covalent attachment(7), cross-linking법(8)이 이용되고 있다. Adsorption법은 고정화 방법이 간단하며 경제적이어서 효소 고정화 시 주로 사용되고 있다(9). 하지만 효소와 support 간의 약한 결합력에 의해 효소반응 중 효소 단백질이 탈착될 가능성이 높아 산업에서의 응용이 어렵다(10). 반면에 cross-linking법의 경우는 효소, support와 cross-linking agent(glutaraldehyde, polyethyleneimine(PEI),

dimethyl suberimidate, dimethyl adipimidate, bis[2-(4-azidosalicylamido)ethyl] disulfide) 간에 결합을 시키고 그 결과 안정적인 효소반응을 할 수 있다(11). Albayrak과 Yang(12)이 PEI를 이용하여 β -galactosidase를 cotton cloth에 고정화하고 pH와 온도 등의 조건에 따라 고정화 효소가 lactose를 galacto-oligosaccharides(GOS)로 분해하는 반응 및 고정화 효소의 활성을 확인하였다. 또한 PEI를 사용함으로써 안정적인 cross-linking을 유도하는데, 이는 PEI와 효소가 결합하여 효소 단백질의 미세 환경을 변화시켜 우수한 안정화 효과를 발휘하는 것으로 알려져 있다(13). 따라서 본 연구에서는 효소 단백질의 변화 없이 support와 강한 결합을 시키기 위하여 PEI를 이용하여 고정화를 실시하였으며 support는 약염기 styrene계 음이온 교환수지를 사용하였다.

Lipase(glycerol ester hydrolase, E.C. 3.1.1.3)는 유지를 가공, 변화시키는 목적으로 사용되는데 유지를 구성하는 지방산의 불포화도, 분포 위치와 chain 길이에 따라 기질의 선택성이 존재한다(14). 따라서 기질의 지방산을 무작위 또는 선택적으로 재배열시키고 이로 인해 이성체의 생성 없이 유지의 물리적, 화학적 특성을 변화시킬 수 있다(15). 현재

Received 5 March 2014; Accepted 22 June 2014

Corresponding author: Ki Teak Lee, Dept. of Food Science and Technology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea
E-mail: ktleee@cnu.ac.kr, Phone: +82-42-821-6729

많은 연구에서 lipase를 이용하여 지방산의 조성을 바꾸거나 위치를 재배열하여 재구성 또는 변형된 유지를 만드는 것을 진행 중이다(10,16). 이와 같은 반응을 interesterification이라 하며 공업적 또는 영양학적 특성을 향상시키려는 목적으로 유지를 화학적, 효소적으로 합성하는 것을 말한다(17,18). 화학적 합성을 할 경우 부가반응이 일어나며 에너지 소비가 많고 유해물질이 남는 등 여러 가지 문제가 발생하는 반면에 미생물로부터 얻을 수 있는 효소를 이용할 경우 대량생산이 가능하며 생산비가 적어 산업적으로 이용하기 용이하다(18,19).

Canola oil은 유채꽃에서 추출한 oil을 개량하여 식용 또는 윤활유 등으로 사용하고 있다. 주요 지방산이 oleic acid로 이루어져 있으며 triacylglycerol(TAG) 조성이 주로 triolein(OOO)으로 구성되어 있다. 따라서 본 연구에서는 효소적 interesterification 반응 시 효소의 위치 특이성 유무를 확인하고자 기질로써 사용하였다(20).

본 연구에서는 *Burkholderia cepacia*로부터 유래한 lipase AH를 PEI와 cross-linking을 이용하여 고정화를 시행하였으며 multi layer와 mono layer 방법을 이용하여 고정화를 진행하였다. 또한 interesterification 반응을 통해 생성된 합성물을 분석하여 고정화 효소의 기질 특이성과 reusability를 확인하고자 하였고 canola oil, palmitic ethyl ester(PEE)와 stearic ethyl ester(StEE)를 기질로 사용하였다.

재료 및 방법

실험 재료

효소 고정화에는 polyethyleneimine([PEI; $(C_2H_5N)_n$], 50% w/v, average molecular weight 750,000), glutaraldehyde(GA, 25% w/v, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)가 사용되었으며, support로는 Treverlite XS-100200을 사용하였다. Bovine serum albumin(Sigma-Aldrich Co.)은 단백질 함량 측정에 사용되었다. 본 연구에서 사용된 기질인 카놀라유(canola oil, ca)는 Hunt Wesson (ConAgra Foods, Inc., Omaha, NE, USA)을 사용하였으며 C마트에서 구입하였다. Interesterification 반응에 이용한 palmitic ethyl ester(PEE, $C_{16:0}$)와 stearic ethyl ester(StEE, $C_{18:0}$)는 (주)네오메가(Daejeon, Korea)에서 제공받아 사용하였다. 사용된 효소는 lipase AH(from *Burkholderia cepacia*)로 Amano Enzyme Inc.(Nagoya, Japan)에서 제공받았다. Support로는 약염기 styrene계 음이온 교환수지를 사용하였으며 기기 분석에 사용된 용매는 모두 분석용 특급용매를 사용하였다.

PEI를 이용한 효소 고정화

Albayrak과 Yang(12)이 보고한 PEI를 이용한 고정화 방법의 일부를 변형시켜 사용하였으며, 본 연구에서는 두 가지

방법으로 고정화를 시행하였다. 두 방법 모두 support에 PEI를 흡착시킨 후 일정 농도의 lipase solution을 넣고 고정화한 다음, glutaraldehyde solution을 이용하여 cross-linking을 하였다. 두 방법 중 첫 번째는 multi layer 방법으로 고정화 과정 중 세척을 하지 않았으며, 두 번째 방법인 mono layer 방법은 support에 PEI를 흡착한 후 세척하였다. 고정화에 사용된 lipase solution은 lipase와 0.05 M tris-HCl buffer(pH 7.0, 7.5, 8.0)를 이용하여 일정 농도(3, 5, 8 mg/mL)로 제조하였다. 그 후 junk와 같은 불순물을 침전시켜 제거하기 위해 원심분리(2,500 rpm, 10분)를 진행하여 상층액을 얻었으며, 이를 고정화에 사용하였다. 또한 cross-linking 후 tris-HCl buffer로 고정화한 효소를 여러 번 수세하고, vacuum oven에서 30°C로 24시간 동안 건조시켜 데시케이터에 보관함으로써 수분을 제어하였다.

Multi layer immobilization(MUIM): 5 mL의 PEI 용액(2.2 mg/mL)과 200 mg의 support를 50 mL vial에 혼합시킨 후 PEI가 support에 흡착되도록 10분 가량 방치하였다. PEI가 충분히 흡착된 후 lipase solution을 10 mL 첨가하였으며, shaking water bath(LSB-0455, Daihan lab-tech Co., Ltd., Namyangju, Korea)를 이용하여 상온(25°C)에서 150 rpm으로 30분 동안 반응하였다. 반응 후 맑은 상층액을 단백질 함량 측정을 위해 5 mL 취한 후 차가운 0.2%(w/v) glutaraldehyde solution 5 mL를 넣고 10분 동안 방치하였다. 이때 cross-linking 전까지의 모든 단계에서 세척을 하지 않았다.

Mono layer immobilization(MOIM): Lipase AH를 고정화하여 효소의 활성을 높이기 위해 Yamazaki 등(21)이 보고한 방법을 변형시켜 사용하였다. 많은 양의 PEI를 support에 흡착시키기 위해 10 mL의 PEI 용액(2.2 mg/mL)을 200 mg의 support와 함께 50 mL vial에 넣고 shaking water bath를 이용하여 상온에서 150 rpm으로 2시간 동안 반응하였다. PEI가 support에 충분히 흡착된 후 증류수로 2번 세척하였다. 그 후 lipase solution을 10 mL 넣고 다시 shaking water bath에서 2시간 반응하였다. 반응 후 상층액 5 mL를 취하여 단백질 측정에 이용하였으며, 고정화 효소가 들어있는 vial에 차가운 2%(w/v) glutaraldehyde solution 5 mL를 넣어 2시간 동안 방치하였다.

단백질 함량 측정

Lipase AH와 support 간의 친화력을 확인하기 위하여 Lowry 등(22)의 방법을 일부 변형시켜 고정화 전(lipase AH)과 후(MUIM, MOIM)의 단백질 함량을 측정하였으며, standard로 bovine serum albumin을 이용하였다. 또한 solution A($CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.5 g + $Na_2C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$ 1 g + 증류수 100 mL) 1 mL와 solution B(Na_2CO_3 20 g + NaOH 4 g + 증류수 100 mL) 50 mL를 혼합하여 solution C로 사용하였으며, Folin-Ciocalteu phenol 10 mL와 증류수 10 mL를 혼합하여 solution D를 제조하였다. 단백질 함량 측정방

법은 다음과 같다. 먼저 lipase AH의 단백질 함량을 측정하기 위해 효소를 tris-HCl buffer에 2 mg/mL의 농도로 희석하였다. 이를 원심분리 한 후 junk와 같은 불순물을 침전시킴으로써 순수 단백질이 녹아있는 상층액만을 얻었다. 취한 상층액 1 mL를 스크류 캡이 있는 15 mL test tube에 넣고 solution C를 2.5 mL 첨가하여 30초간 vortex 한 후 상온에서 10분간 방치하였다. 그 후 solution D를 0.25 mL 가하고 30초간 vortex 한 다음 상온에서 30분간 방치하였다. 이를 spectrophotometer(UV-1700, Shimadzu, Chicago, IL, USA)를 이용하여 562 nm에서 흡광도를 측정하였다. 다음으로 MUIM과 MOIM의 단백질 함량 측정은 위와 같은 방법에서 다음과 같은 조건만을 변경하여 진행하였다. 고정화 후 취한 상층액을 100 μ L 취하여 2 mL의 tris-HCl buffer에 희석하여 사용하였다.

Lipase AH, MUIM 및 MOIM의 interesterification 반응

고정화 효소의 활성을 측정하기 위하여 shaking water bath에서 interesterification 반응을 진행하였다. 반응기질인 Ca, PEE, StEE를 1:1:1의 물 비율로 총 2 g을 취하여 50 mL vial에 첨가하였으며, 효소는 혼합된 총 기질의 10% 무게인 0.2 g을 사용하였다. 또한 효소 혼합물에 3 mL의 hexane을 가하였으며, 이를 shaking water bath에서 46°C, 185 rpm으로 6시간 동안 반응하였다. 반응물을 취하여 0.5 μ m PTFE syringe filter(13JP050AN, Advantec, Tokyo, Japan)로 여과하였으며, N₂를 이용하여 남아있는 hexane을 제거한 후 냉장온도에서 보관하였다.

고정화 효소의 reusability 측정

고정화 효소의 재사용 가능 여부를 확인하기 위하여 reusability를 측정하였다. 반응기질인 Ca, PEE, StEE를 1:1:1의 물 비율로 총 2 g을 취하여 50 mL vial에 첨가하였다. 또한 혼합된 총 기질 무게의 10%인 0.2 g의 효소와 hexane 3 mL를 첨가하였다. 그 후 shaking water bath에서 46°C 185 rpm으로 6시간 동안 반응을 진행하였다. 취한 반응물은 0.5 μ m PTFE syringe filter를 통과시킨 후 질소를 이용하여 용매를 제거하였다. 한편 남아있는 고정화 효소는 hexane으로 여러 번 수세하고 hood에서 하루 동안 방치함으로써 건조시킨 후 다시 interesterification 반응을 진행하였으며, 이를 5번 반복 시행하였다.

Intesterification 합성물의 지방산 조성 분석

고정화한 효소를 사용하여 interesterification 반응을 진행한 후 생성된 합성물의 지방산 조성 분석은 thin layer chromatography(TLC)를 이용하였다. Chloroform 200 μ L에 반응물 50 μ L를 넣고 vortex 한 후 TLC silica plate (20×20 cm, Merck, Darmstadt, Germany)에 spotting 하였다. 그 후 전개용매(petroleum ether : diethyl ether : acetic acid=90:10:1)를 이용하여 TAG 부분을 분리하였으

며, 이를 스크류 캡이 있는 15 mL test tube에 취한 후 gas chromatograph(GC) 분석을 위하여 methylation을 진행하였다. 먼저 0.5 N 수산화나트륨 용액(in ethanol) 1.5 mL를 넣고 30초간 vortex 하여 95°C의 항온수조에서 5분간 반응한 후 25~30°C로 냉각하였다. 그 후 BF₃-methanol을 2 mL 첨가하고 30초간 vortex 하여 95°C의 항온수조에서 반응시킨 후 다시 25~30°C로 냉각하였다. 여기에 iso-octane 2 mL와 1 mL의 포화 NaCl 용액을 넣고 vortex 한 후에 원심분리기(2,500 rpm, 3분)를 이용하여 두 개의 층으로 분리하였다. 상층액을 취하여 anhydrous sodium sulfate column에 통과시킴으로써 수분과 불순물을 제거하였다. 얻어진 methyl ester 형태의 지방산을 GC를 이용하여 분석하였다. 분석에 사용된 GC(YL6100GC, 6000 series, Younglin, Anyang, Korea)의 column으로 SPTM-2560 (100 m×0.25 mm×0.2 μ m)을 사용하였다. Detector는 flame ionized detector(FID)를 사용하였으며, 이때 detector의 온도는 260°C, injector의 온도는 250°C로 하였다. Oven의 온도는 150°C에서 5분간 유지한 후 4°C/min으로 220°C까지 승온 하였으며, 이를 30분간 유지하였다. Carrier gas로는 He를 flow rate 1 mL/min으로 사용하였으며, 시료는 1 μ L를 GC에 주입하여 분석하였다(23).

sn-2 position 지방산 조성 분석

반응물의 sn-2 위치의 지방산 조성을 확인하기 위하여 sn-1, 3 위치 특이성을 가지는 pancreatic lipase를 이용하여 가수분해하였다. 반응물을 스크류 캡이 있는 15 mL test tube에 7 mg 취한 후 7 mL의 1 M Tris-HCl buffer(pH 7.6), 1.75 mL의 0.05% bile salt 용액, 0.7 mL의 2.2% CaCl₂ 용액과 7 mg의 pancreatic lipase를 첨가하였다. 이 혼합물을 vortex 한 후 37°C의 항온수조에서 3분간 진탕하였으며, 이를 2~3회 반복하였다. 그 후 diethyl ether 4 mL를 가하고 vortex 한 후 원심분리기를 이용하여 두 개의 층으로 분리하였으며, 상층액을 anhydrous sodium sulfate column에 통과시킴으로써 수분과 불순물을 제거하였다. 이를 TLC silica plate에 spotting 하였으며, 전개용매(hexane : diethyl ether : acetic acid=50:50:1)를 이용하여 분리하였다. 전개된 TLC plate에서 2-monoacylglycerol(MAG)만을 취하여 methylation한 후 GC를 이용하여 지방산 조성을 분석하였다(24).

Reversed-phase high performance liquid chromatography(RP-HPLC)를 이용한 합성물의 TAG 조성 분석

효소적 interesterification 반응 후 생성된 합성물의 TAG 조성을 확인하기 위하여 RP-HPLC(Younglin)를 사용하였다(25). 기기의 column은 Nova-pak[®]C-18 60 Å 4 μ m (3.9×150 mm I.D., Waters, Milford, Ireland)를 사용하였으며, 펌프는 Younglin SP930D dual pump를 이용하였다. 분석에 사용된 이동상으로는 용매 A(acetonitrile)와 용매

B(iso-propanol : hexane=2:1, v/v)였으며, 용매 A와 B를 80:20(v/v)에서 54:46(v/v)로 45분까지 변화시킨 뒤 15분간 유지하였다. 그 후 80:20(v/v)으로 65분까지 변화시킨 뒤 70분까지 유지하였으며 유속은 1 mL/min이었다. 또한 사용된 detector는 sedex 75 evaporative light scattering detector(ELSD, Seder, Alfortvill, France)였으며 40°C, 2.2 bar로 설정하여 분석하였다(25). 시료는 4 mg/mL의 농도로 chloroform에 완전히 녹여 10 µL injection 하였으며 분석된 TAG의 partition number(PN)의 계산식은 다음과 같다(26).

$$PN = \text{total carbon number (CN)} - 2 \times \text{total number of double bonds (ND)}$$

통계처리

시료 간의 유의적인 차이를 검증하기 위해 SAS(Statistical Analysis System, version 9.01, SAS, Cary, NC, USA)를 이용하였으며 Duncan's multiple range test를 진행하였고 $P < 0.05$ 수준에서 비교하였다(27).

결과 및 고찰

Lipase AH의 고정화 후 단백질 함량

Lipase AH의 고정화 조건을 선정하기 위해 multi layer와 mono layer의 방법으로 pH와 lipase solution의 농도를 달리하여 고정화를 실시하였다. 또한 lipase AH, PEI과 support 간의 친화력을 확인하고자 고정화 후 단백질 함량을 측정하였고, 그 결과는 Table 1과 같다. 고정화 후 lipase 단백질이 고정화된 양을 백분율로 나타낸 것을 bounding protein(%)으로, support(g)에 흡착된 단백질의 양을 mg protein/g support로 나타내었으며, 전체적으로 lipase solution의 농도(3, 5, 8 mg/mL)가 증가할수록 mg protein/g support의 양이 증가하는 경향을 나타내었다. 또한 pH의 변화에 따라 고정화 효소의 단백질 함량이 다르게 나타났다. MUIM의 경우 pH 7.5의 조건에서 다른 pH 조건보다 더 많은 양의 단백질이 고정화된 것으로 보이며, MOIM은

pH 8.0에서 높게 나타났다. Bounding protein(%)의 경우 MUIM은 lipase solution의 농도가 증가할수록 그 양이 증가하는 경향을 나타내었으나, MOIM은 lipase solution의 농도가 증가할수록 감소하였다. 이는 고정화에 사용된 lipase solution 농도가 3 mg/mL가 8 mg/mL보다 총 lipase 단백질 양이 적기 때문에 bounding protein(%)이 높아도 실제 고정화된 lipase의 양은 적은 것으로 생각된다. 따라서 실제 고정화된 lipase의 단백질 양은 mg protein/g support 결과에서 알 수 있듯이 고정화에 사용된 lipase solution 농도가 높아질수록 증가하는 것으로 보인다. 이러한 결과를 종합해 보면, MUIM의 경우 고정화에 사용된 lipase solution의 농도가 8 mg/mL, pH 7.5의 조건에서 bounding protein(%)이 29.14%, 11.32 mg protein/g support로 가장 높게 나타났다. 또한 MOIM의 경우는 사용된 lipase solution 농도가 8 mg/mL, pH 8.0의 조건에서 고정화를 진행하였을 때 bounding protein(%)이 19.96%로 낮게 나타났지만, support에 흡착된 단백질의 함량이 7.68 mg protein/g support로 가장 높게 나타난 것으로 보아 lipase 단백질과 support 간 친화력이 좋은 것으로 판단되었다.

Interesterification 반응을 통한 고정화 효소와 lipase AH의 활성 비교

Multi layer와 mono layer 방법으로 lipase AH를 고정화한 후 그 고정화 효소의 활성을 확인하고자 효소적 interesterification 반응을 진행하였다. 합성에 사용된 기질과 합성물의 위치별 지방산 조성을 GC를 이용하여 분석하였고 TAG와 *sn*-2 position의 결과는 Table 2와 Table 3에 나타내었다. 먼저 고정화 전의 효소인 powder형의 lipase AH의 interesterification 반응 결과에서 합성물의 총 지방산 조성은 palmitic acid(C16:0) 11.69 area%, stearic acid(C18:0) 5.44 area%, oleic acid(C18:1) 56.32 area%, linoleic acid(C18:2) 18.76 area%와 linolenic acid(C18:3) 7.81 area%로 나타났다. 특히 *sn*-2 position에서 palmitic acid 2.19 area%와 stearic acid 1.17 area%로 powder형의 lipase AH는 *sn*-1, 3 위치 특이성을 가지는 것으로 보였다

Table 1. Comparison of protein content of immobilized lipase with different immobilization methods and enzyme solution concentrations

pH	Mono layer				Multi layer		
	Enzyme solution concentration	Bounding protein (%)	Support weight (g)	mg protein/g support	Bounding protein (%)	Support weight (g)	mg protein/g support
7.0	3 mg/mL	20.96±1.01	0.2035	3.79±0.23	14.26±3.29	0.2039	2.53±0.61
	5 mg/mL	15.27±0.25	0.2059	4.33±0.02	21.20±0.76	0.2028	6.11±0.21
	8 mg/mL	12.46±0.00	0.2012	5.58±0.04	25.57±1.74	0.2028	11.32±0.83
7.5	3 mg/mL	22.39±1.36	0.2031	3.62±0.28	20.15±3.17	0.2023	3.27±0.52
	5 mg/mL	15.81±4.13	0.2045	4.02±0.97	23.26±1.28	0.2021	6.00±0.31
	8 mg/mL	13.59±1.24	0.2031	5.19±0.38	29.14±2.77	0.2037	11.11±1.05
8.0	3 mg/mL	37.76±0.72	0.2023	5.74±0.23	6.66±3.14	0.2020	1.02±0.49
	5 mg/mL	25.33±2.47	0.2021	6.42±0.61	19.79±1.60	0.2026	5.00±0.42
	8 mg/mL	19.96±1.33	0.2037	7.68±0.52	24.31±0.09	0.2046	9.32±0.15

Table 2. Fatty acid composition (area%) of reactants from enzymatic interesterification by immobilized lipase (multi layer, MUIM) on weak base styrene resin with using different pH and lipase solution concentration

Fatty acid (area%)	Lipase AH	TAG							
		pH 7.0		pH 7.5		pH 8.0			
		3 mg/mL ³⁾	5 mg/mL	3 mg/mL	5 mg/mL	3 mg/mL	5 mg/mL	3 mg/mL	5 mg/mL
C _{16:0}	11.69±1.15 ^a	7.90±0.21 ^d	9.71±0.21 ^c	10.79±0.14 ^{ab}	9.14±0.12 ^c	10.06±0.40 ^{bc}	10.86±0.23 ^{ab}	6.35±0.04 ^e	8.14±0.09 ^d
C _{18:0}	5.44±0.09 ^{ab}	3.99±0.04 ^{ef}	5.04±0.11 ^{bcd}	5.93±0.40 ^a	4.70±0.18 ^{cd}	5.17±0.49 ^{bc}	5.93±0.17 ^a	2.97±0.06 ^f	3.52±0.04 ^f
C _{18:1}	56.32±0.76 ^f	59.85±0.44 ^c	57.79±0.39 ^e	56.41±0.42 ^f	58.44±0.51 ^{de}	57.32±1.06 ^{ef}	56.21±0.52 ^f	63.03±0.24 ^a	61.60±0.05 ^b
C _{18:2}	18.76±0.31 ^e	20.07±0.01 ^a	19.46±0.01 ^{bc}	19.01±0.02 ^{de}	19.61±0.00 ^b	19.44±0.07 ^{bc}	19.18±0.06 ^{cd}	19.77±0.25 ^{ab}	19.40±0.26 ^{bc}
C _{18:3}	7.81±0.18 ^b	8.19±0.21 ^a	8.00±0.06 ^{ab}	7.86±0.10 ^{ab}	8.11±0.20 ^{ab}	8.01±0.25 ^{ab}	7.82±0.06 ^{ab}	7.88±0.01 ^{ab}	7.34±0.16 ^c
ΣSFA ¹⁾	17.12	11.89	14.75	16.72	13.84	15.23	16.79	9.32	11.66
ΣUSFA ²⁾	82.88	88.11	85.25	83.28	86.16	84.77	83.21	90.68	88.34

Fatty acid (area%)	Lipase AH	<i>sn</i> -2 position							
		pH 7.0		pH 7.5		pH 8.0			
		3 mg/mL ³⁾	5 mg/mL	3 mg/mL	5 mg/mL	3 mg/mL	5 mg/mL	3 mg/mL	5 mg/mL
C _{16:0}	2.19±0.55 ^{bcd}	1.51±0.47 ^{cd}	3.16±0.08 ^{abc}	3.84±2.45 ^{abc}	1.78±0.53 ^{cd}	4.58±0.01 ^a	4.33±0.85 ^{ab}	1.27±0.66 ^d	1.64±0.95 ^{cd}
C _{18:0}	1.17±0.38 ^{ab}	0.75±0.18 ^{ab}	1.63±0.13 ^{ab}	1.87±1.26 ^{ab}	1.02±0.01 ^{ab}	2.08±1.34 ^a	2.22±0.02 ^a	0.40±0.12 ^b	1.14±0.14 ^{ab}
C _{18:1}	53.31±0.37 ^a	55.28±0.20 ^a	55.27±1.35 ^a	53.88±2.05 ^a	55.93±0.40 ^a	56.22±3.02 ^a	53.41±1.39 ^a	54.84±0.48 ^a	54.98±0.30 ^a
C _{18:2}	30.94±0.72 ^{ab}	31.34±0.40 ^a	30.33±2.47 ^{ab}	29.20±2.20 ^{ab}	30.39±0.32 ^{ab}	28.31±0.56 ^b	29.40±1.23 ^{ab}	32.14±0.49 ^a	31.04±0.81 ^{ab}
C _{18:3}	12.39±0.58 ^a	11.12±0.05 ^{abc}	9.61±1.07 ^{cd}	11.21±0.54 ^{abc}	10.88±0.65 ^{abc}	8.81±1.14 ^d	10.64±1.23 ^{bc}	11.35±0.54 ^{ab}	11.20±0.28 ^{abc}
ΣSFA ¹⁾	3.36	2.26	4.79	5.71	2.80	6.66	6.55	1.67	2.78
ΣUSFA ²⁾	96.64	97.74	95.21	94.29	97.20	93.34	93.45	98.33	97.22

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%).³⁾Enzyme solution concentration.^{a-f}Values within the same row without a common letter are significantly different by Duncan's multiple range test at $P<0.05$.

Table 3. Fatty acid composition (area%) of reactants from enzymatic interesterification by immobilized lipase (mono layer, MOIM) on weak base styrene resin with using different pH and lipase solution concentration

Fatty acid (area%)	Lipase AH	TAG					
		pH 7.0		pH 7.5		pH 8.0	
		3 mg/mL ³⁾	5 mg/mL	3 mg/mL	5 mg/mL	3 mg/mL	5 mg/mL
C _{16:0}	11.69±1.15 ^c	6.99±0.06 ^e	10.97±0.45 ^c	7.30±0.14 ^e	9.02±0.48 ^d	11.87±0.28 ^c	13.94±0.15 ^b
C _{18:0}	5.44±0.09 ^d	3.47±0.01 ^f	6.27±0.26 ^c	3.74±0.16 ^f	4.88±0.39 ^e	5.99±0.10 ^c	7.49±0.21 ^b
C _{18:1}	56.32±0.76 ^c	60.31±0.05 ^a	55.34±0.57 ^c	59.88±0.30 ^a	57.86±0.77 ^b	55.38±0.57 ^c	52.69±0.11 ^d
C _{18:2}	18.76±0.31 ^d	20.34±0.00 ^a	19.13±0.10 ^c	20.27±0.01 ^a	19.76±0.13 ^b	18.79±0.01 ^d	18.24±0.13 ^e
C _{18:3}	7.81±0.18 ^{ef}	8.90±0.09 ^a	8.30±0.04 ^d	8.81±0.01 ^{ab}	8.48±0.04 ^{cd}	7.97±0.21 ^e	7.64±0.12 ^f
ΣSFA ¹⁾	17.12	10.46	17.23	11.04	13.90	17.86	21.43
ΣUSFA ²⁾	82.88	89.54	82.77	88.96	86.10	82.14	78.57
<i>sn-2 position</i>							
Fatty acid (area%)	Lipase AH	pH 7.0		pH 7.5		pH 8.0	
		3 mg/mL ³⁾	5 mg/mL	3 mg/mL	5 mg/mL	3 mg/mL	5 mg/mL
		3 mg/mL ³⁾	5 mg/mL	3 mg/mL	5 mg/mL	3 mg/mL	5 mg/mL
C _{16:0}	2.19±0.55 ^{abc}	1.60±0.59 ^c	3.88±1.12 ^{bc}	2.36±0.70 ^{bc}	2.47±0.41 ^{bc}	3.44±2.01 ^{bc}	3.27±0.16 ^b
C _{18:0}	1.17±0.38 ^b	1.03±0.58 ^b	2.07±0.47 ^b	1.51±0.05 ^b	1.56±0.25 ^b	1.79±0.49 ^b	1.86±0.60 ^b
C _{18:1}	53.31±0.37 ^{bc}	55.25±0.22 ^{ab}	54.22±0.96 ^{ab}	54.91±0.58 ^a	54.11±0.30 ^{abc}	54.56±0.77 ^{abc}	54.23±1.74 ^{bc}
C _{18:2}	30.94±0.72 ^a	31.49±0.19 ^a	29.00±0.62 ^{ab}	31.52±0.96 ^a	30.71±0.35 ^a	29.78±2.23 ^{ab}	28.75±1.00 ^{ab}
C _{18:3}	12.39±0.58 ^a	10.63±0.77 ^{abc}	10.83±0.02 ^{abc}	9.70±1.13 ^c	11.15±0.03 ^{abc}	10.43±0.49 ^{abc}	11.89±1.18 ^{abc}
ΣSFA ¹⁾	3.36	2.63	5.95	3.87	4.03	5.23	5.13
ΣUSFA ²⁾	96.64	97.37	94.05	96.13	95.97	94.77	94.87

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%).³⁾Enzyme solution concentration.^{a-e}Values within the same row without a common letter are significantly different by Duncan's multiple range test at $P<0.05$.

(13,16). 따라서 본 연구에서는 이와 같은 특이성을 가지는 lipase AH를 고정화한 후 interesterification 반응을 통해 합성물의 지방산 조성을 분석함으로써 고정화 방법에 따른 고정화 효소의 활성을 비교하고자 하였다. 그 결과 전반적으로 고정화에 사용된 lipase solution의 농도(3, 5, 8 mg/mL)가 높을수록 고정화 효소의 활성이 증가한 것으로 보였으며 유의적 차이가 있었다. MUIM의 경우(Table 2) pH 7.5 lipase solution의 농도가 8 mg/mL의 조건에서 고정화를 진행하였을 때 palmitic acid 10.86 area%와 stearic acid 5.93 area%로 고정화 효소의 활성이 가장 좋았으며, pH 7.0의 경우에는 10.79 area%와 5.93 area%로 lipase AH (Σ SFA, 17.12 area%)의 활성과 유의적 차이가 없었다. 반면에 pH 8의 조건에서 고정화를 진행하였을 경우 그 고정화 효소의 활성(Σ SFA, 9.32~14.38 area%)이 감소하는 것으로 나타났다. 이는 pH 8에서 PEI, lipase 단백질 그리고 support 간의 친화력이 약해졌기 때문이라 생각된다. 또한 *sn*-2 position의 지방산 조성의 경우 TAG의 지방산 조성의 palmitic acid와 stearic acid의 함량이 증가함에 따라 *sn*-2 position의 함량도 증가하는 경향을 나타냈는데, pH 7.5의 조건에서 palmitic acid와 stearic acid의 함량이 4.33 area%와 2.22 area%로 가장 높게 나타났다. 이는 고정화가 진행됨에 따라 효소의 특이성이 변화한 것으로 생각된다. 한편 MOIM의 경우(Table 3) 전체적으로 pH 8의 조건에서 고정화 효소의 활성(Σ SFA 17.86~26.17 area%)이 가장 크게 나타났으며, 특히 lipase solution의 농도가 8 mg/mL, pH 8의 조건에서 고정화하였을 때 palmitic acid와 stearic acid의 함량이 16.29와 9.88 area%로 가장 높은 것으로 확인되었다. 또한 pH 7.0과 pH 7.5의 조건에서 고정화를 하였을 때 각각 Σ SFA가 10.46~17.23 area%, 11.04~17.19 area%로 MUIM((pH 7.0, Σ SFA 11.89~16.72 area%; pH 7.5, Σ SFA 13.84~16.79 area%)과 비슷한 활성을 띠었다. 고정화된 단백질 함량은 MUIM이 더 높게 측정되었으나 효소의 활성이 낮은 이유는 너무 많은 단백질들이 고정화되어 그 활성이 저해된 것으로 생각된다. 반면에 *sn*-2 position의 지방산 조성의 경우는 MUIM과 비슷한 경향으로 나타났는데, TAG의 지방산 조성에서 palmitic acid와 stearic acid가 많이 합성된 만큼 *sn*-2 position에도 함량이 증가하였다. 이를 통해 고정화를 진행하면서 lipase AH가 가지고 있던 *sn*-1, 3 위치특이성이 감소하는 것으로 보였으며 고정화로 인하여 기존의 특이성이 무작위 특이성으로 변화한 것으로 생각된다. 이와 같은 결과를 토대로 MUIM과 MOIM의 고정화 조건을 설정하여 연구를 진행하였다.

RP-HPLC를 통한 interesterification 합성물의 TAG 조성 비교

효소적 interesterification을 통해 생성된 합성물의 TAG 조성을 확인하기 위하여 RP-HPLC를 사용하였고 그 결과를 Fig. 1에 나타내었다. TAG를 구성하고 있는 3개의 지방

Fig. 1. RP-HPLC chromatograms from enzymatic interesterification reactants by immobilized lipases on weak base styrene resin (molar ratio=canola oil : palmitic ethyl ester : stearic ethyl ester=1:1:1, enzyme=multi layer (MUIM) and mono layer (MOIM), temperature=46°C, reaction time=6 hr, shaking water bath reactor). (A) canola oil, (B) reactants by MUIM, (C) reactants by MOIM. 1, LOO; 2, LPO/LOP; 3, OOO; 4, POO/SLO; 5, SOO; 6, PSO/POS; 7, SOS.

산 사슬 길이 및 불포화도에 따라 PN(partition number)으로 분석하였으며, 합성물의 TAG는 PN 42~52의 범위에 피크가 분포되어 있음을 확인하였다. 본 연구에서 사용된 기질인 canola oil의 경우 PN=42~50의 범위에 분포하였으며 대부분의 TAG 조성은 PN=48의 OOO(49.92 area%)와 PN=46의 LOO(29.64 area%)로 구성되어 있음을 확인하였다. 한편 MUIM과 MOIM을 사용하여 interesterification 반응을 통해 생성된 합성물을 분석한 결과, PN=48의 OOO와 PN=46의 LOO는 감소하고 PN=48의 POO/SLO, POP와 PN=46의 POO, LPO/LOP area%가 증가하는 경향을 나타내었다. 또한 PN=50의 SOO, PSO/POS와 PN=52의 SOS area%가 증가하였다. 이는 기질로 사용된 palmitic ethyl ester와 stearic ethyl ester가 합성됨에 따라 증가한 것으로 보인다. 반면 lipase AH의 경우 반응이 진행됨에 따라 OOO가 49.92 area%에서 39.27 area%로 감소하였으며 POO/SLO가 13.80 area%, LPO/LOP가 7.23 area%로 증가하였다. 또한 SOO의 경우 0.59 area%에서 3.52 area%로 나타났다. 한편 MUIM의 경우 OOO가 27.61 area%로 감소하였고 POO/SLO가 22.88 area%, LPO/LOP가 11.84 area%로 증가하였다. SOO의 경우는 5.28 area%로 나타났으며 lipase AH보다 효소의 활성이 높은 것으로 보인다. MOIM의 활성이 가장 높게 나타났는데 OOO는 15.11 area%로 감소하였으며 POO/SLO는 31.93 area%, LPO/

LOP는 13.40 area% 그리고 SOO는 10.57 area%로 확인되었다. 이와 같은 결과를 바탕으로 주로 OOO와 LOO로 조성되었던 기질이 효소적 interesterification 반응을 통해 palmitic acid와 stearic acid가 합성되어 POO/SLO, LPO/LOP와 SOO, SOS 등으로 이루어진 합성물로 나타난 것으로 보인다.

고정화 효소의 reusability

PEI를 이용하여 고정화한 효소 MUIM과 MOIM의 재사용 가능 여부를 확인하기 위해 1회 사용 시 6시간 동안 효소적 interesterification 반응을 진행하였으며, 이를 총 5회 반복하였다. 또한 5번 재사용함에 따라 MUIM과 MOIM의 활성 변화를 관찰하기 위해 합성물의 TAG 조성과 *sn*-2 position 조성을 GC로 분석하였으며 이를 Fig. 2에 나타내었다. 그 결과 5회 반복하여 사용하였을 경우 전체적으로 고정화 효소의 활성이 감소하지 않은 것으로 보아 고정화 효소를 여러 번 재사용하여도 효소의 활성이 유지된다는 것을 알 수 있었다. MUIM의 경우 1회 반응 시 total saturated fatty acid(Σ SFA=palmitic+stearic acid)의 함량이 17.12 area%로 나타났으며 2~5회 반복 시 17.05~17.48 area%로 효소의 활성이 유지되었다. 이는 lipase 단백질이 support에 단단히 고정화되어 여러 번 반복하여 반응하여도 탈착되지 않고 붙어있다는 것을 알 수 있다. 또한 *sn*-2 position의 경우도

1~5회 사용 시 Σ SFA의 함량이 4.70~5.41 area%로 효소의 활성이 유지되는 것을 확인하였다. 한편 MOIM의 경우는 1회 반응 시 Σ SFA의 함량이 29.77 area%로 나타났다. 하지만 2회 반응하였을 때는 Σ SFA의 함량이 42.28로 고정화 효소의 활성이 높아졌으며 3~5회 반응 시 42.82~43.26 area%로 그 활성이 유지되었다. 이와 같은 결과로 PEI를 이용하여 효소를 고정화하였을 경우 여러 번 반복하여 사용하여도 고정화 효소의 활성이 감소하지 않는 것으로 생각된다.

시간에 따른 lipase AH와 고정화 효소의 활성 비교

PEI를 이용하여 고정화한 효소인 MUIM과 MOIM의 활성을 확인하기 위해 고정화 전의 효소인 lipase AH의 활성과 비교하였다. 반응시간(1, 3, 6, 12, 24, 48시간)에 따른 합성물들의 지방산 조성을 분석한 결과는 Fig. 3에 나타내었다. 먼저 TAG의 지방산 조성을 확인한 결과, 전체적으로 시간이 증가할수록 Σ SFA의 함량은 증가하였으며 12시간 이후로는 효소의 활성이 많이 증가하지는 않았다. Lipase AH의 경우 1시간에서 Σ SFA가 9.61 area%로 나타났으며 12시간에서 21.24 area%, 48시간에서 35.42 area%로 나타났으며, 시간이 증가할수록 Σ SFA도 증가하는 경향을 나타내었다. 반면 MUIM의 경우 Σ SFA가 1시간에서 8.90 area%, 3시간에서 11.27 area%로 lipase AH보다 활성이 떨어졌지

Fig. 2. Total saturated fatty acid composition (area%) of reactants on reusability from the different immobilized lipases on weak base styrene resin by batch type reactor. (A) TAG, (B) *sn*-2.

Fig. 3. Total saturated fatty acid composition (area%) of reactants from enzymatic interesterification by immobilized lipases on weak base styrene resin with the different times (1, 3, 6, 12, 24, 48 hr). (A) TAG, (B) *sn*-2.

만, 6시간에서 22.97 area%로 lipase AH(6시간, 17.12 area%)보다 높아졌다. 또한 12~48시간은 32.35~40.56 area%로 반응시간이 증가할수록 Σ SFA가 증가하였지만, 12시간부터 Σ SFA 함량의 증가 비율은 감소하였다. 반면 MOIM의 경우 Σ SFA가 1시간에서 12.26 area%로 MUIM(3시간, 11.27 area%)과 lipase AH(3시간, 12.67 area%)보다 높은 경향을 나타내었다. 또한 12~48시간 반응 후 Σ SFA의 함량은 38.83~44.23 area%로 증가하였으며, 12시간 반응 이후 Σ SFA의 함량이 크게 증가하지는 않았다. 이와 같은 결과를 통해 MUIM과 MOIM은 12시간 이상 반응하면 시간대비 반응효율이 떨어지는 것으로 생각된다. 한편 반응시간의 증가에 따른 고정화 전의 *sn*-1, 3 특이성이 고정화 후에 변화하는지 확인하기 위하여 *sn*-2 position의 지방산 조성을 확인하였다. 전체적으로 반응시간이 증가할수록 *sn*-2 position의 Σ SFA 함량이 증가하는 것으로 보아 고정화를 진행함에 따라 무작위 특이성으로 변화한 것으로 확인할 수 있었다. Lipase AH의 경우 1~12시간 반응할 경우 Σ SFA 함량이 0~4.60 area%로 낮게 나타났으나 24시간에서 10.79 area%, 48시간에서 21.71 area%로 증가하였다. 반면에 MUIM의 경우는 1~48시간에서 Σ SFA의 함량이 1.83~34.72 area%로 나타나 반응시간이 증가할수록 *sn*-2 position의 Σ SFA 함량이 증가하는 것으로 보였다. 또한 MOIM의 경우 반응시간이 1~6시간일 때 Σ SFA의 함량이 2.71~13.69 area%로 나타났으며 12시간 반응 시 30.19 area%로 Σ SFA 함량이 급격하게 증가하였다. 이상의 결과를 종합해보면 반응시간이 증가함에 따라 lipase AH, MUIM과 MOIM의 활성은 증가하고 기존의 *sn*-1, 3 특이성을 가지는 효소가 고정화됨으로써 무작위 특이성으로 변화한 것을 알 수 있었다.

온도 변화에 따른 lipase AH와 고정화 효소의 활성 비교

고정화 효소와 고정화 전의 효소인 lipase AH의 온도 차이에 따른 활성 변화를 확인하기 위하여 반응온도를 달리하여 효소적 interesterification 반응을 진행하였으며 그 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 전체적으로 반응온도가 높을수록 효소의 활성은 증가하는 경향을 나타내었으며 lipase AH, MUIM과 MOIM 모두 70°C에서 Σ SFA의 함량이 각각 20.61, 25.37, 32.02 area%로 효소들의 활성이 가장 좋았다. 반면에 25°C에서 lipase AH, MUIM과 MOIM의 Σ SFA의 함량이 각각 11.93, 17.09, 24.14 area%로 46°C와 70°C의 조건보다 효소의 활성이 떨어지는 것으로 확인되었다. 이는 기질로 사용된 palmitic ethyl ester와 stearic ethyl ester의 melting point가 상온보다 높은 24, 31~33.4°C로 상온에서 semi solid 형태로 존재하기 때문에 효소의 활성 저해 원인으로 생각된다(28). 또한 *sn*-2 position의 경우도 TAG 조성의 결과와 비슷한 경향으로 나타내었는데 효소의 특성이 무작위 특이성으로 변화하여 Σ SFA의 함량이 증가하였다. 또한 25°C의 경우 기질이 일정부분 결정

Fig. 4. Total saturated fatty acid composition (area%) of reactants from enzymatic interesterification by immobilized lipases on weak base styrene resin with the different temperatures (25, 46, 70°C). (A) TAG, (B) *sn*-2.

을 형성하고 있어 Σ SFA의 함량이 각각 2.23, 3.03, 5.46 area%로 낮게 나타난 것으로 보인다.

요 약

본 연구는 polyethyleneimine(PEI)을 이용하여 음이온계 레진에 비 고정화 효소인 lipase AH(*Burkholderia cepacia*)를 고정화한 후 효소적 interesterification을 통해 고정화 효소의 반응 특성을 확인하고자 하였다. 효소적 interesterification에 canola oil, palmitic ethyl ester와 stearic ethyl ester를 기질로 사용하였으며 합성물의 TAG 조성 분석을 통해 특성 연구를 진행하였다. 또한 두 가지 고정화 방법(multi layer, mono layer)으로 고정화를 진행하였으며 사용된 lipase solution의 농도와 pH를 달리하여 실시하였다. 먼저 효소와 support 간의 친화력을 확인하기 위하여 단백질 함량을 측정하였다. 그 결과 고정화에 사용된 lipase solution의 농도가 8 mg/mL일 때 친화력이 좋았으며 MUIM의 경우 pH 7.5에서, MOIM의 경우 pH 8.0에서 고정화 효율이 가장 좋았다. 또한 고정화 효소의 활성을 확인하기 위하여 interesterification을 진행하였고 TAG와 *sn*-2 position 분석을 통하여 활성을 비교하였다. 이러한 결과를 참고하여 가장 친화력이 좋았던 조건에서 고정화를 진행하였다. 그 결과 MUIM의 경우 total saturated fatty acid(Σ SFA)의

함량이 16.79 area%였으며 MOIM의 경우는 Σ SFA의 함량이 26.17 area%로 나타났다. 반면에 *sn*-2 position 분석 결과 MUIM과 MOIM 모두 palmitic acid와 stearic acid의 함량이 증가한 경향을 나타내었는데, 이는 기존의 *sn*-1, 3 특이성을 가지는 lipase AH가 고정화를 통해 무작위 특이성으로 변화한 것으로 생각되었다. 또한 RP-HPLC를 이용하여 TAG의 조성을 확인한 결과, 기질은 canola oil이 주로 OOO와 LOO로 조성되었으나 고정화 효소의 interesterification 반응 후 합성물은 주로 POO/SLO, LPO/LOP와 SOO, SOS 등으로 이루어진 것으로 확인되었다. 위와 같은 결과를 바탕으로 최종 생산된 MUIM과 MOIM을 이용하여 interesterification 반응을 온도, 시간을 달리하여 진행하였다. 전체적으로 MOIM의 활성이 가장 높았으며 lipase AH, MOIM과 MUIM 모두 반응시간이 증가할수록 Σ SFA의 함량은 증가하였으나 12시간 이후로는 시간대비 효율은 크게 증가하지 않았다. 또한 시간이 증가함에 따라 *sn*-2 position의 Σ SFA 함량이 높아졌다. 한편 반응온도가 높을수록 Σ SFA의 함량도 증가하였는데, 이는 상온인 25°C보다 높은 melting point를 가지는 stearic ethyl ester와 palmitic ethyl ester가 semi solid 형태로 존재하여 활성이 저해된 것으로 생각된다. 또한 lipase AH는 재사용이 불가능하였지만 고정화 효소인 MUIM과 MOIM은 5번을 재사용하여도 그 효소의 활성이 유지되는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 토대로 음이온계 레진에 PEI를 이용하여 lipase AH를 고정화하였을 경우 비 고정화 효소인 lipase AH보다 MUIM과 MOIM의 활성이 더 높아 산업적으로 이용 가능할 것으로 생각된다.

감사의 글

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

REFERENCES

- Kim JK, Park JK, Kim HK. 2004. Synthesis and characterization of nanoporous silica support for enzyme immobilization. *Colloids Surf, A* 241: 113-117.
- Lee KT, Akoh CC. 1998. Immobilization of lipases on clay, Celite 545, diethylaminoethyl-, and carboxymethyl-Sephadex and their interesterification activity. *Biotechnol Tech* 12: 381-384.
- Malcata FX, Reyes HR, Garcia HS, Hill CG, Amundson CH. 1992. Kinetics and mechanism of reactions catalyzed by immobilized lipases. *Enzyme Microb Technol* 12: 426-446.
- Balco VM, Paiva AL, Malcata FX. 1996. Bioreactors with immobilized lipases: state of the art. *Enzyme Microb Technol* 18: 392-416.
- Ye P, Jiang J, Xu ZK. 2007. Adsorption and activity of lipase from *Candida rugosa* on the chitosan-modified poly(acrylonitrile-co-maleic acid) membrane surface. *Colloids Surf, B* 60: 62-67.
- Wang Y, Caruso F. 2005. Mesoporous silica spheres as supports for enzyme immobilization and encapsulation. *Chem Mater* 17: 953-961.
- Bai YX, Li YF, Yang Y, Yi LX. 2006. Covalent immobilization of triacylglycerol lipase onto functionalized novel mesoporous silica supports. *J Biotechnol* 125: 574-582.
- Yu HW, Chen H, Wang X, Yang YY, Ching CB. 2006. Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) with controlled particles: Application to *Candida rugosa* lipase. *J Mol Catal B: Enzym* 43: 124-127.
- Wang HX, Wu H, Ho CT, Weng XC. 2006. Cocoa butter equivalent from enzymatic interesterification of tea seed oil and fatty acid methyl esters. *Food Chem* 97: 661-665.
- Lee KT, Akoh CC. 1998. Structured lipids: synthesis and applications. *Food Rev Int* 14: 17-34.
- López-Gallego F, Betancor L, Hidalgo A, Alonso N, Fernández-Lafuente R, Guisán JM. 2005. Coaggregation of enzymes and polyethyleneimine: a simple method to prepare stable and immobilized derivatives of glutaryl acylase. *Biomacromolecules* 6: 1839-1842.
- Albayrak N, Yang ST. 2002. Immobilization of β -galactosidase on fibrous matrix by polyethyleneimine for production of galacto-oligosaccharides from lactose. *Biotechnol Prog* 18: 240-251.
- Andersson MM, Hatti-Kaul R. 1999. Protein stabilising effect of polyethyleneimine. *J Biotechnol* 72: 21-31.
- Jaeger KE, Ransack S, Dijkstra BW, Colson C, Van Heuvel M, Misset O. 1994. Bacterial lipases. *FEMS Microbiol Rev* 151: 29-63.
- Lee KT, Foglia TA, Lee JH. 2005. Low-calorie fat substitutes: synthesis and analysis. In *Handbook of Industrial Biocatalysis*. Hou C, ed. CRC press, Boca Raton, FL, USA. Vol 16, p 1-19.
- Lee KT, Foglia TA. 2000. Synthesis, purification and characterization of structured lipids produced from chicken fat. *J Am Oil Chem Soc* 77: 1027-1034.
- Macrae AR. 1983. Lipase-catalyzed interesterification of oils and fats. *J Am Oil Chem Soc* 60: 291-294.
- Posorske LH. 1984. Industrial-scale application of enzymes to the fats and oil industry. *J Am Oil Chem Soc* 61: 1758-1760.
- Cho EJ, Lee JH, Lee KT. 2004. Optimization of enzymatic synthesis condition of structured lipids by response surface methodology. *Korean J Food Sci Technol* 36: 531-536.
- Jang YS. 2002. Prospect and situation of quality improvement in oil seed rape. *Korean J Crop Sci* 47: 175-185.
- Yamazaki H, Cheok RKH, Fraser ADE. 1984. Immobilization of invertase on polyethylenimine-coated cotton cloth. *Biotechnol Lett* 6: 165-170.
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
- AOAC. 2000. *Official methods of analysis*. 17th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, USA. p 20-24.
- Lee KT, Akoh CC. 1996. Immobilized lipase-catalyzed production of structured lipids with eicosapentaenoic acid at specific positions. *J Am Oil Chem Soc* 73: 611-615.
- 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. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40: 1430-1437.
- Lee KT, Jones KC, Foglia TA. 2002. Separation of struc-

- tured lipids by high performance liquid chromatography. *Chromatographia* 55: 197-201.
27. SAS. 2002. SAS/STAT User's Guide release 9.01. Statistical Analysis Systems Institute, Inc., Cary, NC, USA.
28. Knothe G. 2005. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. *Fuel Process Technol* 86: 1059-1070.