

**효소의 부가 및 전환반응을 이용한 난황 내  
기능성 지질과 고도불포화지방산을 함유한  
인지질의 생합성 및 고부가가치 제품의 개발**

(Highly value added product and functional phospholipid contained polyunsaturated fatty acid in egg yolk - development of transesterification and phosphorylation with enzymatic processes)

(주)고센바이오텍

농림수산물식품자료실



0018185

농림수산물식품부

# 제 출 문

## 농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “효소의 부가 및 치환반응을 이용한 난황 내 기능성 지질과 고도불포화지방산을 함유한 인지질의 생합성 및 고부가가치 제품의 개발(Highly value added product and functional phospholipid contained polyunsaturated fatty acid in egg yolk - development of transesterification and phosphorylation with enzymatic processes)”의 보고서로 제출합니다.

2009 년 4 월 24 일

주관연구기관명 : (주)고센바이오텍

주관연구책임자 : 김 예 경

연 구 원 : 서 영 석

연 구 원 : 최 선 윤

연 구 원 : 이 은 희

연 구 원 : 권 유 립

연 구 원 : 김 진 희

위탁연구기관명 : 부경대학교

위탁연구책임자 : 전 병 수

연 구 원 : 신 언 미

연 구 원 : 김 영 란

연 구 원 : 조 영 제

## 보고서 요약서

연구과제명	효소의 부가 및 치환반응을 이용한 난황 내 기능성 지질과 고도불포화지방산을 함유한 인지질의 생합성 및 고부가가치 제품의 개발			
	Highly value added product and functional phospholipid contained polyunsaturated fatty acid in egg yolk - development of transesterification and phosphorylation with enzymatic processes			
연구책임자	소속	(주)고센바이오텍	성명	김 예 경
연구비	3억6천만원	연구기간	2006. 04. 25 ~ 2009. 04. 24 (3년)	
요약	<p>1. 국산배추로부터 포스포리파아제 D (PLD) 를 온화하고 무독한 공정조건으로 정제하여 배추 kg 당 PLD 7,500U 이상을 분리하였고, phosphatidylserine 생산에 사용가능하였다.</p> <p>2. 인지질과 고도불포화지방산의 에스테르 치환 반응의 조건을 최적화하기 위하여 다양한 조건 하에서 실험을 수행하여, 고도불포화지방산을 30%가량 포함한 인지질을 생성할 수 있었다.</p> <p>3. 자체 생산한 배추 PLD를 이용한 PS 생산의 조건을 탐색하기 위하여 당사의 난황레시틴(GL-90E)으로 PS 생성율을 54% 까지 높였고 PS정제 기술을 이용하여 순도 60% 이상이 가능했다.</p>			
연구결과 발표실적 및 예정	<p>1. 상품화 추진 예정 : Phosphatidylserine, Phospholipid-DHA</p> <p>2. 논문 게재 (심사중)</p> <p>(1) 포스포리파아제 D : 배추로부터 산업적 분리 공정과 난황레시틴 용액 중의 효소 특성</p> <p>(2) 포스파티딜세린 합성 특성 : 양배추 포스포리파아제 D에 의한 난황 레시틴의 염기전이반응 특성</p> <p>(3) 포스파티딜세린 합성 공정 : 배추 포스포리파아제 D에 의한 난황레시틴의 염기전이반응 공정</p> <p>(4) 포스포리파아제의 고정화 방법 : 포스포리파아제 A와 포스포리파아제 D의 고정화 방법에 따른 고정화 효소 특성</p> <p>3. 특허 출원 {심사 중}</p> <p>(1) 배추 포스포리파아제 D의 대량 생산 방법 출원번호 : 10-2009-0028860</p> <p>(2) 배추 포스포리파아제 D의 크로마토그래피 정제 방법 출원번호 : 10-2009-0028861</p> <p>(3) 양배추 포스포리파아제 D에 의한 난황 레시틴의 포스파티딜세린 합성 방법 (출원 예정) 출원번호 10-2009-</p> <p>(4) 배추 포스포리파아제 D에 의한 난황 레시틴의 포스파티딜세린 합성 방법(출원 예정) 출원번호 : 10-2009-</p> <p>(5) 포스포리파아제의 고정화 방법 : 포스포리파아제 A (PLA) 와 포스포리파아제 D (PLD) 의 고정화 방법에 따른 고정화 효소 특성 (출원 검토 중) 출원번호 : 10-2009-</p>			

# 요 약 문

## I. 제 목

효소의 부가 및 치환반응을 이용한 난황 내 기능성 지질과 고도불포화지방산을 함유한 인지질의 생합성 및 고부가가치 제품의 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

### 1. PL-PUFA 생산

(레시틴을 이용한 지방산기의 치환반응)

효소를 이용한 지방산의 transesterification 반응-고도불포화 지방산과 제한적으로 결합되어 있는 레시틴과 반응시킴으로 시장에서 요구하는 기능성 지방산 및 인지질을 생산할 수 있다. 현재 거래되고 있는 정제된 고도불포화지방산 등은 이미 그 기술수준이 향상되고, 생산수율이 높아져 점점 저가에 거래되고 있는 실정이다. phospholipid를 PLA2 효소와 반응, 분자 내에 결합되어 있는 지방산과 외부의 지방산의 transesterification 반응을 이용하므로 고도불포화지방산 결합 인지질 또는 레시틴을 생산할 수 있게 된다.

### 2. 배추 PLD 효소 정제 및 고정화

(국내산 배추로부터 포스포리파아제 D 의 정제 및 고정화)

농산 부산물로부터의 효소의 탐색 및 정제/분리-효소의 치환 및 부가반응을 이용한 합성 반응에서 필수적인 식물 유래의 효소 PLD를 국내에서 풍부하게 생산 및 거래되고 있는 당근, 양배추 등의 국내 농산물을 통하여 저렴하게 생산할 수 있는 방안을 간구한다. 또한 Ultrafiltration, Affinity Chromatography, Membrane filter 등을 이용한 상업적 생산 스케일 및 기술을 연구한다. 최종적으로는 효소산업의 최대 단점이라 할 수 있는 일회성의 사용에서 벗어나 흡착제 등을 통하여 고순도로 분리된 효소를 polymer 유도체, silica 등에 흡착시키는 방법을 연구함으로써 그 사용 횟수와 빈도를 높여 생산 공정의 단순화 및 비용의 절감화를 목표로 한다. 특히 PLA는 고정화하지 않으면 반응 촉매 능력이 나타나지 않으므로 반드시 고정화하여야 한다.

### 3. PS 생산

(레시틴을 이용한 극성부분의 치환반응)

PLD의 고유 반응인 transphosphorylation을 이용하여 자연계에서 가장 높은 비율로 존재하는, 특히 난황 내 인지질의 80% 이상을 차지하고 있는 PC를 그 주 기질로 하여 반응을 실시한다. 또한 난황에서 천연의 상태로 존재하고 있는 고도불포화지방산인 ARA, DHA 등을 함유하고 있는 유일한 원료인 난황유래 인지질의 이용으로 최종적으로 생산되어지는 PS, PE 등에서 인체 내의 생체막 구조와 가장 유사한 형태인 기능성 인지질을 합성할 수 있다.

## Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

### 1. PL-PUFA 생산

ARA 및 DHA등 자연계에서 소량만이 인지질에 결합되어 있는 원료, 즉 난황인지질을 이용하여 transesterification을 실시하였다. 생산 공정의 원료를 이용한 반응 실험을 병행하고, 에탄올 및 CO<sub>2</sub>를 이용한 생산 및 반응 실험을 실시하였다. 효율적 방법은 주어진 factor 즉, 기질, 효소 및 농도의 최적화 등이 반드시 이루어져야 함으로 pH, 온도, 반응시간을 확인하였다.

반응을 이루기 위한 조건 및 시간, pH, 수율 등을 실험하며 반응되어지는 생산물들은 HPLC, GC등을 이용하여 그 반응정도를 확인하였다.

### 2. 배추 PLD 정제 및 특성

여러 농산물을 이용하여 효소 추출방법을 하고 효소의 활성 및 순도를 분석하는 방법을 체계화하였다. 효소의 상업적 생산 방법 확립, 데이터화하고 Pilot scale의 적용, 생산비용의 절감, 효소 수율 향상 모색하였다. 분리된 효소들은 ion-exchange chromatography 및 ultrafiltration, crystallizing 방법을 이용하여 정제하여 효소의 특성을 파악하였고, 실제 상업적 생산 및 이용에 필요한 lifespan을 늘렸다.

추출된 효소를 SDS-PAGE 등을 이용하여 단백질의 크기 및 조성을 확인하고, 각각의 활성을 측정하였다.

### 3. 효소 고정화 (PLA, PLD)

공정중의 중간산물을 통하여 효소의 고정화(immobilization) 의 안정성을 탐색하였다. 고정화 효소의 안정성과 활성도 보호를 위한 고정화 방법을 탐색하여 고정화 반응 조건 인자의 개별적 영향을 분석하고, 적용 가능한 고정화 방법을 수행하였다

Immobilization activity yield 와 efficiency를 통해 고정화 방법의 적절성, 효율을 측정하였다. 반응 수율을 높이기 위한 조건 실험, 효소의 재사용 및 사용횟수, 활성도 등을 측정하였다.

### 4. PS 생산 - 양배추 PLD 이용

PS 생산 조건을 탐색하기 위하여 상업화된 양배추 PLD를 이용하여 PS 생산 방법을 탐구했다. 반응온도, pH, 유화제, 흡착제 등에 대해 실험 했다. 반응된 생산물들은 HPLC으로 분석하고, 기질과 효소의 종류에 따라 각각의 polar head(인지질 염기 부분) 에 따른 특이성 및 반응정도, 수율 등을 확인하였다.

### 5. PS 생산 - 배추 PLD 이용

배추 PLD를 자체 생산한 것을 이용한 PS 생산의 조건을 탐색하기 위하여 당사의 난황레시틴(GL-90E)로 PS 생산 수율을 높이기 위한 조건 실험, 효소의 활성도, 안정성 등을 측정하였고, 생산설비로의 전환 시 요구되는 factor를 분석하였다. 기질 농도, 반응 온도, 반응 시간, 교반 조건 등을 분석하였다.

### 6. PS 정제

PS 생성 반응 수율이 효소의 활성 감소나 기질 지방산 조성에 따라 반응 수율이 변동하므로 이를 극복하기 반응 생성물에서 PS 를 정제하는 방법을 탐구하였다.

## IV. 연구개발결과

### 1. PL-PUFA 생산

인지질과 고도불포화지방산의 에스테르 치환 반응의 조건을 최적화하기

위하여 다양한 조건 하에서 실험을 수행하였다. 그 결과, 고도불포화지방산을 30%가량 포함한 인지질을 생성할 수 있었다. 또한 라이소 인지질로 가수 분해되지 않은 인지질 67%를 얻을 수 있었다. 고정화된 Lipozyme 효소를 이용한 경우, 효소와 기질의 분리가 편리할 뿐만 아니라 Lecitase 효소에 비하여 높은 전환율과 인지질 회수율의 결과를 얻었다. 더불어 초임계 이산화탄소 추출 공정을 통하여 60분 내에 지방산과 인지질을 분리하여 98%의 고순도 인지질을 얻을 수 있었다.

## 2. 배추 PLD 정제 및 특성

배추로부터 포스포리파아제 D (PLD) 를 온화하고 무독한 공정조건으로 정제하였다. 대량생산이 가능한 정제법을 정립하였고, 여과, 침전, 원심분리 등을 조합한 공정을 사용하였다. 온도를 상온 이하로 유지하면서 여과를 단계별로 하고, 열, 용매, 염 등에 의한 침전을 유도하고, 원심 분리하여 정제하였다. 이로써 처리 조건이 쉬운 공정들의 조합을 이용한 PLD 의 추출 및 분리는 실용적이고 효과적이었다. 1차 분리된 배추 PLD의 비활성은 30 ~ 40 unit/mg 수준이었으며, 난황 포스파티딜콜린 (Egg PC)이 주성분인 난황 레시틴 (GL-90E) 용액에서 PLD의 안정성이 높아져서 50℃에서 48시간 이상 반응이 가능했다. 그 결과 포스파티딜세린(PS) 합성에 대한 산업적 적용성을 높였다.

## 3. 효소 고정화 (PLA2, PLD)

공유결합법을 이용한 고정화 효소는 200 시간 연속사용 이후에도 활성도를 80% 이상 유지하였으며, Alginate-silicate sol-gel matrix 또한 80% 대의 초기 활성도를 유지하여 공정에 사용하기에 무리가 없는 안정적인 고정화 효소 제조법임을 증명하였다. 특히 Sol-gel matrix 의 경우 제조과정이 간소하고, 비용이 저렴하여 상업화를 위한 다양한 장점을 제시하였다.

효소 분자간 공유결합 (enzyme cross linking) 과 실리카 겔 표면 공유결합을 동시에 작용하여 효소의 공정화 효율과 활성을 높였다. PLA 의 경우 글루타르알데히드와 실리카 겔에 의해 이 고정화법이 수행되었고, 효소 활성도 용액 상태의 효소 활성이 유지 되었다. PLD 의 경우도 마찬가지로 방법으로 고정화했을 때, 효소 활성이 고정화 시약에 따라 민감하게 변화하였으나, 유사하게 유지되는 조건을 찾았다.

## 4. PS 생산 - 양배추 PLD 이용

상업화된 cabbage 유래의 PLD 효소를 이용하여 PC를 기질로 한 포스파티딜기 전이반응을 수행하였다. 유기용매의 독성으로 인한 식품에서의 문제점을 줄이기 위해 수계시스템 하에 반응을 수행하였고, PS 반응에 관여하는 인자들을 고려하여 반응 조건을 최적화함으로써 40% 이상의 PS(포스파티딜세린)를 생성하였으며, 90% 이상의 인지질 회수율을 확보하는 재현성 있는 반응법을 수립하였다. HPLC를 이용한 인지질 프로파일 분석법을 확보, 안정화 하였다.

## 5. PS 생산 - 배추 PLD 반응

자체 생산한 배추 PLD를 이용한 PS 생산의 조건을 탐색하기 위하여 당사의 난황레시틴(GL-90E)로 PS 생성율을 54% 까지 높였다. 조건 실험, 효소의 활성도, 안정성 등을 측정하였고, 생산설비로의 전환 시 요구되는 factor를 분석하였다. 기질 농도, 반응 온도, 반응 시간, 교반 조건 등을 분석하였다. 실험을 통하여 기질의 종류 및 함량, pH, 반응시간, 반응온도, 계면활성제의 종류 등에 따른 PS 생성반응의 조건을 최적화하였으며, 양배추 PLD와 국산배추 PLD의 PS 생성 조건의 차이를 비교해 보았다. 이를 통하여 배추 PLD를 이용하여 기질로 순수 PC가 아닌 GL-90E로부터 PS 전환율이 최고 53.6%로 나타나 양배추 PLD에 비해 높은 전환율을 나타내었다.

## 6. PS 정제

배추유래 PLD를 사용하여 최적화된 조건에서 PS 반응을 수행하였으며, 생성 반응 후 45%의 PS와 38%의 PA가 생성되었다. 이 반응생성물을 NaCl 염침전법과 에틸아세테이트 수성2상계 추출법을 이용하여 PS를 정제하였다. 실험 결과 남아있는 기질인 PC와 생성된 일부의 PA가 제거되는 용이한 결과를 얻었으며, 이 때의 PS 함량은 63%, PA는 30%로 고순도의 PS 제품을 생산할 수 있었다.

# V. 연구 성과 및 성과활용 계획

1. 논문 게재 (4 건)
2. 특허 출원 (4~5 건)
3. PS 제품화
4. PL-DHA 제품화



# SUMMARY

## (영문요약문)

### I. Title

Highly value added product and functional phospholipid containing polyunsaturated fatty acid in egg yolk - development of transesterification and transphosphatidylation with enzymatic processes

### II. Goal and Background

#### 1. production of PL-PUFA

(transesterification of fatty acids of lecithin)

Transesterification method which enables the reaction between fatty acids and phospholipids with limited amount of polyunsaturated fatty acids allows development of functional fatty acids and phospholipids which have been demanded from the market.

In the current market situation, the price of purified polyunsaturated fatty acid products have been decreased so far due to the development of production process as well as increased yield of productivity. Through the enzymatic reaction process which utilizes transesterification between free fatty acids and fatty acids in phospholipid molecule, it is possible to produce polyunsaturated fatty acid enhanced phospholipid or lecithin.

#### 2. purification and immobilization of enzyme

Explorative efforts have been made to find a cost effective production method of plant PLD from domestic trading agricultural resources such as carrot, cabbage and the like which are easily accessible. PLD is the essential material in the current research project which encompasses the enzyme screening from agricultural

resources and purification, separation, as well as enzymatic reaction including interesterification and transphosphatidylation.

Various technologies such as ultrafiltration, affinity chromatography, membrane filtration have been tried to establish scale-up process and technologies. The final goal is to develop the method which enables a simple and cost effective production process of purified PLD in immobilized state onto carriers like polymer derivatives and silica to increase the number of usage by recycling.

### 3. Production of Phosphatidylserine

(transphosphatidylation of the polar head group of lecithin )

By utilizing the transphosphatidylation which is a characteristic reaction scheme of PLD, the synthetic reaction can be performed using PC as a substrate which is a major constituent comprising 80% of phospholipids in egg yolk. By which, it is possible to synthesize the cell membrane mimicking functional phospholipid containing PS, PE by making use of egg yolk phospholipids which contain naturally occurring polyunsaturated fatty acids such as ARA, DHA.

## III. Subjects and scope

### 1. Production of PL-PUFA

Transesterification reaction has been performed with egg yolk phospholipids which only contain ARA and DHA in nature among various phospholipids. Production and reaction experiments have been performed using ethanol and carbon dioxide concurrently with the reaction using interim raw material from the plant. Because the enzymatic reaction requires the optimization of condition parameters including substrates, enzyme dosage, concentration, etc. The pH value, temperature, reaction time have been monitored.

Monitoring of reaction by assaying the resulting material with GC, HPLC has been performed as well as experiments with various conditions including pH, reaction time, yield.

## 2. Purification and property identification of chinese cabbage

Systematic assay methods to analyze the enzyme activity and purity after extracting from various agricultural plants have been established.

Scale-up production process of enzyme was explored and resulting data information have been collected. And subsequent pilot scale tests have been made and cost effective process development with increased yield were taken.

The lifespan of the chinese cabbage enzyme was enhanced, which is required for a commercial production using affinity chromatography, ultrafiltration, and crystallizing technologies.

Molecular weight and characteristic features have been identified with SDS-PAGE and other various analytical methods.

## 3. Enzyme immobilization (PLA2, PLD)

Stability of immobilized enzyme has been monitored using interim lecithin product. Exploration of effective immobilization method to enhance the stability and protection factors of enzyme activity has been performed through analyzing individual influencing factors. And applicable immobilization methods have been tried.

To evaluate the relevance and efficiency of immobilization method, immobilization yield and efficiency have been analyzed. Experiments to enhance the reaction yield, analysis of recyclability and residual activity have been performed.

## 4. PS production - with cabbage PLD

To evaluate the parameters of PS production, commercial cabbage PLD has been used. Resultant after reaction has been analyzed with HPLC, and different kinds of substrates, PLDs from different sources were tried to evaluate the characteristic properties such as reaction efficiency, yield as well as influential effect by different polar head group.

## 5. PS production – with chinese cabbage PLD

Using chinese cabbage PLD prepared in our laboratory, production condition of PS has been evaluated. Consequently, experiments to enhance the production yield of PS with egg yolk lecithin(GL-90E), activity analysis, stability evaluation, influencing factor analysis required for scale-up to production scale have been performed. Parameters evaluated were substrate amount, reaction temperature, reaction time, agitation condition, etc.

## 6. PS purification

PS synthesis reaction was performed under optimized condition using chinese cabbage PLD to produce 45% and 38% for PS and PA respectively. PS purification was performed using NaCl salting out method and aqueous 2 phase extraction with ethyl acetate. As a result PC which is a major substrate and residual PA has been easily isolated, and finally 63% of PS and 30% of PA have been recovered to produce highly purified PS product.

# IV. Result

## 1. Production of PL-PUFA

Experiments under various conditions to optimize the interesterification reaction of phospholipid and PUFA (polyunsaturated fatty acids) were made. As a result phospholipid containing 30% of PUFA was synthesized. And non-hydrolyzed phospholipid into lysophospholipid was recovered as much as 67%. When it comes to immobilized Lipozyme(TM), it was easily separated from the substrate, and showed relatively high incorporation rate of PUFA and phospholipid recovery yield compared to Lecitase(TM). Highly purified phospholipid up to 98% was recovered by supercritical carbon dioxide extraction method in 60 min to separate the free fatty acids from phospholipids.

## 2. Purification and characterization of chinese cabbage

Phospholipase D(PLD) from chinese cabbage was purified with mild and nontoxic process. Scalable purification method to mass production was established by combining filtration, precipitation, centrifugation. Multiple cascading filtration steps with chilling below ambient temperature were performed. Precipitation of the enzyme was induced by heating, organic solvent, and salt and subsequent centrifugation process was performed.

The established process combining various relatively easy methods to extract and separate PLD was practical and effective.

The specific activity of the first chinese cabbage PLD was around 30~40 unit/mg, the stability of which was enhanced in the egg yolk lecithin(GL-90E) solution mostly consisting of egg phosphatidylcholine. Hence it was possible to react for 48 hours and more at 50°C. As a result, industrial application of phosphatidylserine synthesis became promising.

## 3. Enzyme immobilization (PLA2, PLD)

Immobilized enzyme with covalent binding method maintained 80% of the initial activity for 200 hour usage, and alginate-silicate sol-gel matrix method showed great stability to be used in industrial production by maintaining 80% of the initial activity. Especially, sol-gel matrix method can be implemented with easy and cheap production process and showed several advantages to be applied in commercialization.

Production efficiency and activity were enhanced by the method in which enzyme crosslinking and covalent binding onto the surface of silica gel were implemented simultaneously. PLA was immobilized using glutaraldehyde and silica gel, and the immobilized enzyme maintained the activity of liquid state. PLD was immobilized using the same method as well, and its activity varied more delicately by

different amount of crosslinking agent, but the appropriate level of dosage was found after all.

#### 4. PS production – with cabbage PLD

Transphosphatidylation using PC as a substrate with commercial cabbage PLD was performed. To avoid toxicity of organic solvent, reaction experiments were performed in aqueous system. After optimizing reaction condition, over 40% of PS(phosphatidylserine) was synthesized and reproducible reaction method with over 90% of phospholipid recovery was established. Analysis method of phospholipid profile with HPLC was established and stabilized.

#### 5. PS production – with chinese cabbage PLD

After experimental trials to optimize the reaction condition with the inhouse chinese cabbage PLD, PS synthesis was increased up to 54% using egg yolk lecithin(GL-90E) produced by Goshenbiotech. Various reaction conditions were screened and enzyme activity, stability were analyzed and subsequent analysis was made for the necessary factors for scaling up to commercial plant. These factors include substrate concentration, reaction temperature, reaction time, agitation state. Through the experimental screening process, optimized condition of PS synthesis was found by balancing factors such as substrate species and purity, pH value, reaction time, temperature, surfactant. And comparison of ps synthesis condition between conventional cabbage PLD and domestic chinese cabbage PLD was made. By taking into account of this finding, PS was synthesized up to 53.6% from not a pure PC but a GL-90E, and this shows greater conversion activity of chinese cabbage PLD than cabbage PLD.

#### 6. PS purification

Salting out method with NaCl and two phase aqueous extraction with

ethyl acetate were applied to purify the PS. The result showed that it is possible to easily isolate PC with residual PA and enhance the purity of PS.

## V. Achievement and application plan

1. Publishing in journals (4 articles)
2. Patent pending (4~5 items)
3. Commercialization of PS
4. Commercialization of PL-DHA

# Contents

Chapter 1 Overview .....	1
Section 1 Goal .....	1
Section 2 Background and scope .....	2
Chapter 2 State of the Art .....	5
Section 1 Production of PL-PUFA .....	5
Section 2 Purification and characterization of PLD .....	6
Section 3 Immobilization of enzyme .....	7
Section 4 Production of PS .....	8
Chapter 3 Experiments and results .....	9
Section 1 Production of PL-PUFA .....	9
Section 2 Purification and characterization of PLD .....	44
Section 3 Immobilization of enzyme .....	70
Section 4 Production of PS with cabbage PLD .....	93
Section 4 Production of PS with chinese cabbage PLD .....	104
Section 4 Purification of PS .....	112
Chapter 4 Achievement and contribution .....	117
Section 1 Goal and evaluation .....	117
Section 2 Results and achievements .....	118
Chapter 5 Achievment and application plan .....	119
Section 1 Commercialization plan .....	119
Section 2 Publishing plan .....	119
Section 3 Interlectual property .....	120
Section 4 Future research .....	120
Chapter 6 Overseas resource .....	121
Chapter 7 Reference .....	122



# 목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	1
제 1 절 연구개발과제의 목적 .....	1
제 2 절 연구개발과제의 필요성 및 범위 .....	2
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	5
제 1 절 PL-PUFA 생산 .....	5
제 2 절 PLD 정제 및 특성 .....	6
제 3 절 효소 고정화 .....	7
제 4 절 PS 생산 .....	8
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 .....	9
제 1 절 PL-PUFA 생산 .....	9
제 2 절 PLD 정제 및 특성 .....	44
제 3 절 효소 고정화 (PLA2, PLD) .....	70
제 4 절 PS 생산 - 양배추 PLD 이용 .....	93
제 5 절 PS 생산 - 국산배추 PLD를 이용한 PS 생산 .....	104
제 6 절 PS 정제 .....	112
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	117
제 1 절 연구개발의 목표 및 평가의 착안점 .....	117
제 2 절 연구개발 수행내용 및 목표달성도 .....	118
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획 .....	119
제 1 절 실용화 및 산업화 계획 .....	119
제 2 절 기술 확산 계획 .....	119
제 3 절 지적 재산권 확보 계획 .....	120
제 4 절 추가 연구 및 타 연구 활용 계획 .....	120
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	121
제 7 장 참고문헌 .....	122

## 제 1 장 연구개발과제의 개요

### 제 1 절 연구개발과제의 목적

#### 1. 농림수산식품 산업 기여

본 연구로 인하여 제한적이고 저부가가치의 산업일 수밖에 없는 1차 농축산업의 구조를 벗어나, 기능성을 지니면서도 고부가가치를 얻을 수 있는 새로운 상품 및 제품의 개발이 가능할 것으로 본다. 이는 사회적으로나 문화적으로 점점 증가하는 노인인구의 문제 즉, 노인성 질환 및 뇌 기능 저하로 유래되는 많은 질병에 대처할 수 있는 예방식품으로써의 기능을 수행할 수 있을 것으로 기대한다. 이를 바탕으로 임상 실험 및 기초연구의 지속적인 투자와 기술개발로 인해 국내의 시장뿐만 아니라 세계의 시장에서도 국내 바이오산업의 기술성과 우수성을 알릴 수 있는 좋은 계기가 될 것이며, 저품질 및 저가에 치우친 국내 농축 산업에도 새로운 가능성을 지닌 모델로 평가받을 수 있을 것이다.

#### 2. 효소 공학적 기술 실용화

뿐만 아니라, 효소를 이용한 생물학적 공정은 까다롭고 제한적인 식품 및 의약품 원료를 생산/제조함에 있어서 물리적인 방법으로는 쉽지 않은 정제, 개질, 분리, 합성 등의 공정에 쉽고 빠르게 적용할 수 있는 장점이 있다. 본 연구과제에서 사용된 지질 분해 효소 이외에 세계적으로는 미생물, 식물 유래의 효소 등을 이용하여 이미 상업적으로 생산하고 있는 것이 실정이다. 유독 국내에서는 기술기반의 미비와 인프라 구조의 미비로 인해 적용하기가 쉽지 않고 많은 제약이 따랐던 현재의 상황을 세계적인 수준으로 끌어 올리고, 이를 통해 수입에만 의존할 수밖에 없었던 원료 및 식품시장에서 상당한 우위를 점하리라 생각된다. 이를 통하여 실험실내에서만 이루어져 왔던 많은 논문들과 아이디어들이 이제는 제품 및 생산 공정에 접목이 되어 한 단계 높은 부가가치를 지니고 기능성을 지닌 제품 및 상품을 개발해가는 좋은 로드맵이 될 수 있을 것으로 기대한다.

## 제 2 절 연구개발과제의 필요성 및 범위

### 1. PL-PUFA 생산

#### 가. 필요성

ARA 나 DHA 등 기능성 지방산에 대한 수요는 지속적이다. 그러나 이 성분은 자연계에서 소량만이 인지질에 결합되어 있으므로 난황 인지질 등을 이용하여 transesterification 하는 기술 개발이 필요하였다.

#### 나. 범위

DHA등 자연계에서 소량만이 인지질에 결합되어 있는 원료, 즉 난황인지질을 이용하여 transesterification을 실시하였다. 생산 공정의 원료를 이용한 반응 실험을 병행하고, 에탄올 및 CO<sub>2</sub>를 이용한 생산 및 반응실험을 실시하였다. 효소적 방법은 주어진 factor 즉, 기질, 효소 및 농도의 최적화 등이 반드시 이루어져야 함으로 pH, 온도, 반응시간을 확인하였다.

반응을 이루기 위한 조건 및 시간, pH, 수율 등을 실험하며 반응되어지는 생산물들은 HPLC, GC등을 이용하여 그 반응정도를 확인하였다.

### 2. 배추 PLD 정제 및 특성

#### 가. 필요성

국산배추로부터 PLD 조효소를 추출하여 PS 생산용으로 사용하기 위하여 정제가 필요하였다. 그리고 PS 생산 조건을 탐색하기 위하여 효소의 특성을 파악하여야 하였다.

#### 나. 범위

여러 농산물을 이용하여 효소 추출방법을 하고 효소의 활성 및 순도를 분석하는 방법을 체계화하였다. 효소의 상업적 생산 방법 확립, 데이터화하고 Pilot scale의 적용, 생산비용의 절감화/수율 향상 모색하였다. 효소의 추출 조건을 개선하여 상업적 생산 및 이용에 필요한 lifespan 늘렸다.

추출/분리되어진 효소들은 ion-exchange chromatography 및 ultrafiltration, crystallizing 방법을 이용하여 정제하였고, 정제된 효소를 SDS-page, electrophoresis 등을 이용하여 단백질의 크기 및 특성 등을 확인하고, 각각의 활성을 측정하였다.

### 3. 효소 고정화 (PLA, PLD)

#### 가. 필요성

효소의 약점이 반응 후, 생성물과 함께 반응계에서 배출되므로 대개 1회용으로 손실되는 것이 문제이다. 그리고 액상의 효소가 불안정하거나 활성이 낮은 경우도 있다. 특히 PLA는 고정화하지 않으면 반응 촉매 능력이 나타나지 않으므로 반드시 고정화하여야 한다.

#### 나. 범위

공정중의 중간산물을 통하여 효소의 immobilization 의 안정성을 탐색하였다. 고정화 효소의 안정성과 활성도 보호를 위한 고정화 방법을 탐색하여 고정화 반응 조건 인자의 개별적 영향을 분석하고, 적용 가능한 고정화 방법을 수행하였다

고정화 활성 수율 (immobilization activity yield) 과 효율 (efficiency) 을 통해 고정화 방법의 적절성, 효율을 측정하였다. 반응 수율을 높이기 위한 조건 실험, 효소의 재사용 및 사용횟수, 활성도 등을 측정하였다.

### 4. PS 생산 - 양배추 PLD 이용

#### 가. 필요성

PS 생산 조건을 탐색하기 위하여 상업화된 양배추 PLD를 이용하여 PS 생산 방법을 탐구했다. 식물 유래 PLD 의 정제 기술이 산업적 실용성이 있도록 기술 축적이 되기 전에 기존 상품화 양배추 PLD 에 의한 실험이 필요하였다.

#### 나. 범위

PS 생산의 반응 조건을 온도, pH, 기질 종류, 반응 첨가물, 유화제, 담체 등을 변화시키고 각각의 기여를 PS 수율 측면에서 반응 실험 하였다.

반응된 생산물들은 HPLC으로 분석하고, 기질과 효소의 종류에 따라 각각의 포스포리파아제 D에 대한 특이성 및 반응정도, 수율 등을 확인하였다. 지질 첨가나 실리카 겔의 첨가에 대한 실험이 특히 포스포리파아제 D 반응 특성을 파악하였다.

## 5. PS 생산 - 배추 PLD 반응

### 가. 필요성

본 연구 과제 진행 중에 자체 생산한 배추 PLD를 이용한 PS 생산의 조건을 탐색하기 위하여 반응 조건과 특성을 연구하였다.

### 나. 범위

당사의 난황레시틴(GL-90E)로 PS 생산 수율을 높이기 위한 조건 실험, 효소의 활성화도, 안정성 등을 측정하였고, 생산설비로의 전환 시 요구되는 factor를 분석하였다. 기질 농도, 반응 온도, 반응 시간, 교반 조건 등을 분석하였다.

## 6. PS 정제

### 가. 필요성

PS 생성 반응 수율이 효소의 활성 감소나 기질 지방산 조성에 따라 반응 수율이 변동하므로 이를 극복하기 위한 보완 기술로 개발하였다.

### 나. 범위

PLD 생성 반응 생성물로부터 PS 를 정제하는 방법을 탐구하였다. 실험 대상은 알코올 용액에서 NaCl 침전법과 에틸아세테이트-물-에탄올 수성2상계에서의 추출법이였다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 PL-PUFA 생산

#### 1. 기술 가치

본 연구는 고도불포화지방산과 인지질을 기질로 사용하여, 효소 반응을 통한 고도불포화지방산을 다량 함유한 고기능성 인지질의 제조에 그 목표를 두고 있으며 그에 동반되는 기초 반응 실험 및 반응 조건의 최적화에 연구의 초점을 맞추었다. 그 결과 전환율을 30% 이상으로 높였다.

#### 2. 국내 기술

최근 PUFA와 인지질의 관계에 관한 연구 보고에 따르면, Sn-2위치에 PUFA를 포함하는 포스파티딜콜린(phosphatidyl choline, PC)은 다른 위치의 이성질체에 비하여 체내에서 더 쉽게 소화되기 때문에 영양학적, 의학적으로 적용하기에 유용하다 국내에서는 지질의 기능성을 이용하기 위한 연구 위주이다.

#### 3. 외국 기술

외국에서는 종양 세포의 저해제로 작용하는 생물학적 기능이 있어 백혈병에도 응용이 가능하다고 보고된 바 있다. (Hosokawa, 1999; Sakai, 1992; Janski, 1995; Calviello, 1998) 더불어 인지질은 고도불포화지방산과 결합하여 뇌에 고도불포화지방산을 공급하는 주요 수단으로 알려져 있다. (Magret, 1998)

#### 4. 발전 방향

제품의 회수와 재료의 효율적 사용이 경제성을 결정할 것이다. 따라서 미반응 재료 회수와 생성된 제품의 정제의 최적화 정도에 따라 경쟁력을 높일 수 있다.

## 제 2 절 PLD 정제 및 특성

### 1. 기술 가치

본 연구의 배추(<http://www.brassica-resource.org/>) PLD 는 비활성(specific activity)과 총활성(total activity)이 높아서 공업적 용도에 적합하게 경제적으로 정제되었음을 확인하였다. 침전법으로 1차 정제된 상태의 배추 PLD로 배추 kg 당 약 1,000 unit 이상의 효소가 생산 가능하였다. 배추 PLD 침전물의 가수분해활성이 30 ~ 40 unit/mg 로서, 기존의 양배추 PLD 부분 정제 연구(Lee, Hae-Ik, 1991)에서 PC 가수분해활성이 1.02 unit/mg 이고, 글리세롤 전이반응이 1.08 unit/mg로 보고된 것에 비해 30 배 이상 높은 비활성(specific activity)이었다.

### 2. 국내 기술

PLD는 Streptomyces, Streptomyces 등의 미생물(Lim, Si-Kyu, 2002, 2002; Son, Dong-Hwa, 2003, 2004) 에서부터 고등식물 (Koh, Eun-Hie, 1989; 1996; 2006) 이나 포유류에 이르기까지 생물계에 널리 분포되어 있으며, 인지질 제조 반응 뿐 만 아니라 생체신호 전달 관련 효소 기능에 대한 연구도 다양하다().

PLD는 세포막을 통과하는 형태를 취하고 있다. 세포막의 소수성 부위 및 극성 부위와 모두 결합한 형태로 추출이 어렵다고 연구되고 있다. 많은 연구 보고에서 크로마토그래피를 이용하여 정제하였고 순도가 높은 효소를 제조하는데 장점이 있다. 그러나 이런 공정들은 공업적 대량생산할 때, 불규칙적인 생산규모와 일정 때문에 생산된 효소의 품질의 재현이 어렵고 비활성 (specific activity) 이 매우 낮아 1 unit/mg 이하이거나 정제수율이 효소 활성 회수율 (enzyme recovery yield) 수% 이하이었다(Gupta, Munishwar N., 2001, 2001, 2004).

### 3. 외국 기술

외국에서도 방선균 PLD를 크로마토그래피로 수십 unit/mg, 수성이상계 추출(14-16)로 수백 unit/mg 까지 정제한 사례가 보고된 바도 있으나, 효소 활성 회수율(enzyme activity recovery yield)이 5 ~ 10 %로서 손실이 매우 커서 산업적 이용 가능성이 낮고, 수성이상계는 PEG 같은 화학물질이 첨가되어 식품에 응용이 곤란하다(Gupta, Munishwar N., 2001, 2001,

2004; Sharma, S., 2004).

#### 4. 발전 방향

효소의 효소 활성 회수율(enzyme activity recovery yield)과 순도(enzyme purity)의 향상에 대한 연구가 계속 될 수 있다.

### 제 3 절 효소 고정화

#### 1. 기술 가치

본 연구를 통해, 실리카 겔 표면에 효소 가교 결합(enzyme cross linkage)에 의한 PLA 효소 덩이 입자를 고정화한 결과 효소 활성이 고정화 전과 유사하게 유지되고 효소 회수도 용이하였다.

enzyme yield 60%, 4회 사용 후 초기 활성도 80%를 유지하는 Alginate-silicate sol-gel matrix 및 covalent binding 고정화 법을 수립하였고, 두 가지 고정화 방법 모두 Enzyme yield, 반응 안정성에서 비슷한 결과를 보여 효소 고정화를 위한 scale-up 및 life-span 확장을 위한 기초 연구 성과를 거두었다.

#### 2. 국내 기술

알긴산이나 키토산 담체에 고정화하는 것이 많이 연구되었으며, 이온교환 수지에 정전기적 고정화, 그리고 공유 결합법 등이 개발되고 있으나 특징적으로 보고된 논문은 없다.

#### 3. 외국 기술

효소의 고정화에 대해 많이 연구되었으며, 이온교환 수지나 실리카 비드 또는 알긴산 키노산 비드에 대해 연구 되었다. 담체 뿐 만 아니라 고정화 시약의 반응 순서나, 담체의 복합적 혼용 등에 대한 연구도 진행되어 알긴산과 실리카겔의 조합 등이 연구되었다(Gupta, Munishwar N., 2001; Dittrich, N., 2001).

#### 4. 발전 방향

효소의 활성의 유지와 효소 고정화 활성 수율 등에 대한 연구는 기질과 반응 조건의 변화에 따라 지속적인 연구가 필요한 분야이다.



## 제 4 절 PS 생산

### 1. 기술 가치

본 연구의 PS 생산은 식품 유래 PLD를 이용한 PS 생산으로 그 유래가 없다. 기존 기술은 주로 방선균 유래 PLD를 이용하고 대두 레시틴 (soy lecithin)을 재료로 PS를 생산하였다. 따라서 효소의 추출 원료가 농산물이 라는 장점이 있다.

### 2. 국내 기술

기존 기술은 (주)두산바이오텍 등에서 방선균 유래 PLD를 이용하고 대두 레시틴 (soy lecithin)을 재료로 PS를 생산하였다.

### 3. 외국 기술

방선균 유래 PLD를 고정화 효소를 이용하고 대두 레시틴 (soy lecithin)을 재료로 PS를 생산하였다.(Dittrich, N.,2001; Iwasaki, Y., 2003)

### 4. 발전 방향

다양한 PLD를 고정화 효소를 이용하고 다양한 레시틴을 재료로 PS를 생산하는 연구가 가능하다. PS 제품의 안정성에 대한 연구가 필요하다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 PL-PUFA 생산

#### 1. 연구 배경

인지질(Phospholipids)은 자연계에 존재하는 천연 유화제로서 인을 함유한 복합지질이다. 또한 친수기의 인산기와 소수기의 지방산을 가진 양친매성을 띠는 무독성의 계면활성제로써 식품, 화장품, 의약품, 그 밖의 산업재의 제조에 천연 계면활성제로 널리 활용되고 있다. 더불어 인지질의 생리활성 기능인 콜레스테롤 조절, 혈행 개선 및 두뇌영양공급 등의 기능을 이용하여 기능성 식품의 원료로도 점차 그 사용이 확대되고 있는 추세다. 고순도로 정제한 인지질의 경우, 현재 의학용 주사제의 원료로 사용되고 있다.

인지질은 식물성 유래의 대두 인지질과 동물성 유래의 난황 인지질로 크게 분류되며, 두 종류의 인지질은 구성 성분과 그 쓰임새에 차이를 가지고 있다. 보통 대두 인지질이 식품의 유화제로 많이 쓰이는 반면 난황 인지질은 대두 인지질보다 뛰어난 물성과 유화력으로 화장품의 유화제 또는 유아용 조제분유의 원료로 사용되고 있다.

인지질의 구조는 글리세롤(glycerol) 골격에 두 개의 지방산과 한 개의 인산기로 이루어져있는데 글리세롤 골격에 어떠한 지방산이 붙는가에 따라서 인지질의 기능이 달라진다. 일반적으로 두 번째 위치의 아실(acyl)기는 고도불포화지방산(Poly-unsaturated fatty acid, PUFA)과 구조적으로 안정적인 결합을 이루며 첫 번째 위치의 아실기는 상대적으로 짧은 탄소수를 가진 포화지방산(Saturated fatty acid)과 결합을 한다. 인지질이 체내에서 소화, 흡수될 경우, 두 번째 위치의 지방산은 이자로부터 분비된 인지질 분해 효소인 포스포리파제 A2(Phospholipase A2)에 의하여 가수 분해되어, 라이소인지질(Lyso-phospholipids)과 지방산으로 분리된다. 이 때 생성된 라이소인지질은 간의 Lyso-phosphatidyl choline acyltransferase에 의하여 지방산을 다시 에스테르화(Esterification)하여 칼로마이크론(임파관)의 형태로 운반되어 체내로 흡수되게 한다. 때문에 두 번째 위치에 결합해있는 지방산 중, 고도불포화지방산의 함량이 높을수록 체내로 흡수될 수 있는 확률이 높아진다. 이런 고도불포화지방산들은 대부분 불안정한 cis형을 취하고 있어 포화지방산이 체내에 축적되는 것과는 달리 생리 작용에 필수적으로 필요한 역할을 한다. 특히 오메가-3계열의 지방산은 에이코사노이드(eicosanoids)

중 혈관 이완인자인 프로스타글란딘(prostaglandin)의 형성을 주도하여 혈전증이나 심근경색증의 감소에 생리적 활성기능을 나타내는 것으로 알려지고 있다. 또한 간에서 중성지방의 합성을 억제하며, 혈중 콜레스테롤의 수준을 저하시키는 기능도 가지고 있다. 일반적으로 WHO와 FDA(1994)에서는 오메가-3 계열과 오메가-6 계열의 지방산 섭취 비율을 1:5~1:10으로 권장하고 있다. 이러한 불포화 지방산은 체내에서 합성이 제한적이기 때문에 식이 섭취가 필수적이다.

최근 고도불포화지방산과 인지질의 관계에 관한 연구 보고에 따르면, Sn-2 위치에 고도불포화지방산을 포함하는 포스파티딜콜린(phosphatidyl choline, PC)은 다른 위치의 이성질체에 비하여 체내에서 더 쉽게 소화되기 때문에 영양학적, 의학적으로 적용하기에 유용하다고 밝혀졌으며, 또한 종양 세포의 저해제로 작용하는 생물학적 기능이 있어 백혈병에도 응용이 가능하다고 보고된 바 있다. (Hosokawa, 1999; Sakai, 1992; Jensi, 1995; Calviello, 1998) 더불어 인지질은 고도불포화지방산과 결합하여 뇌에 고도불포화지방산을 공급하는 주요 수단으로 알려져 있다. (Magret, 1998)

본 연구는 고도불포화지방산과 인지질을 기질로 사용하여, 효소 반응을 통한 고도불포화지방산을 다량 함유한 고기능성 인지질의 제조에 그 목표를 두고 있으며 그에 동반되는 기초 반응 실험 및 반응 조건의 최적화에 연구의 초점을 맞추었다.

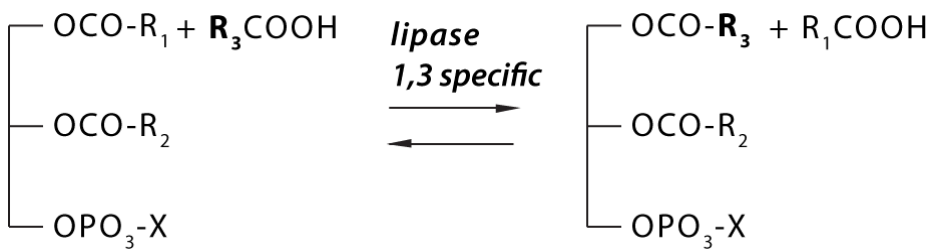


그림 1 Schematic presentation of interesterification of phospholipase by lipase, where R<sub>1</sub>,R<sub>2</sub>,R<sub>3</sub> represent fatty acids as acyl donors and X represents head group.

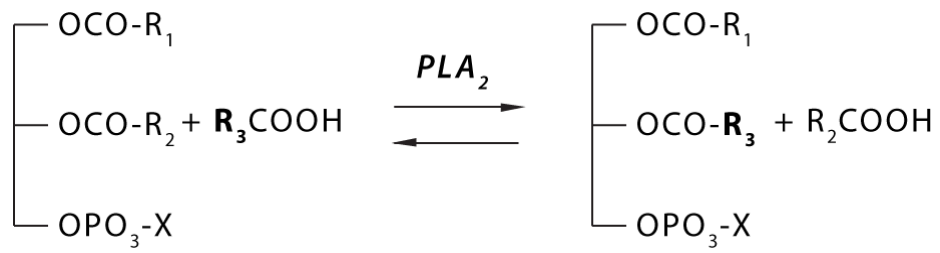


그림 2 Schematic presentation of interesterification of phospholipid by PLA<sub>2</sub>(phospholipase A<sub>2</sub>) where R<sub>1</sub>,R<sub>2</sub>,R<sub>3</sub> represent fatty acids as acyl donors, and X represents head group.

## 2. 연구 방법

### 가. 실험 재료

사용한 효소는 중성 지질의 지방산 분해 효소인 리포자임(Lipozyme)과 인지질의 지방산 분해 효소인 포스포리파제(Phospholipase)이며, 두 효소 모두 가수 분해와 에스테르 치환 반응을 촉매 하는 효소이다. 따라서 가수 분해를 최소화하며 동시에 에스테르 치환 반응의 효율을 높이기 위해 다양한 조건의 변화를 주었다. 효소는 리포자임 계열의 Lipozyme TL IM, Lipozyme RM IM, Lipozyme TL 100L과 포스포리파제 계열의 Lecitase Ultra(Phospholipase A1), Lecitase 10L(Phospholipase A2, Novozyme, Denmark)를 사용하였다. (표 1. 스크리닝 효소의 종류 및 특성)

아실기 공여체(Acyl donor)로 사용될 지방산은 자유지방산 형태의 DHA (DHA-FFA 80, DHA free fatty acids 80% 이상, (주)캠포트)를 사용하였다.

인지질은 기질 별 반응 특성을 알아보기 위하여 난황유레 PC(Egg, Sn-1,2 glycerophosphatidylcholine min. 99%, Avanti polar lipids, Inc.), LPC (egg,sn-2 lysophosphatidylcholine, min. 98%, Avanti polar lipids, Inc.), GL-90E (egg phospholipid, phospholipids min. 90%, Goshenbiotech, Inc.)를 사용하였다.

반응에 사용한 증류수는 미량의 금속성분을 제거한 deionized water 를 이용하였으며, 반응 중에 첨가한 각종 유기용매는 주정 알코올(95%)을 제외하고 모두 시약 grade(99% 이상), 또는 HPLC/UV spectrometry 급(99.9%)을 이용하였다.

초임계 이산화탄소 추출(supercritical fluid extraction)에 사용된 용매인 이산화탄소는 싸이폰 탱크 형태의 고순도 이산화탄소(99.99%)를 사용하였다.

표 1. 스크리닝 효소의 종류 및 특성

Enzyme	Source	type
Lipozyme TL IM	<i>Thermomyces lanuginosa</i>	silica granule type 1,3-specific immobilized lipase
Lipozyme RM IM,	<i>Rhizomucor miehei</i>	resin type 1,3-specific immobilized lipase
Lipozyme TL 100L	<i>Thermomyces lanuginosa</i>	1,3-specific liquid lipase
Lecitase Ultra	<i>Aspergillus oryzae</i>	Sn-1 specific liquid phospholipase
Lecitase 10L	Porcine pancreas	Sn-2 specific liquid phospholipase

## 나. 실험 방법

### (1) 효소 스크리닝

본 연구에서는 효소적 반응을 위해 리파아제(lipase)와 포스포리파아제(phospholipase)를 병용하였다.

리파아제(lipase)는 트리글리세라이드(triglyceride)를 기질로 하여 글리세롤 골격과 지방산이 결합한 아실기의 분리, 결합을 촉매하여 반응을 촉진시키는 역할을 한다. 리파아제는 트리글리세라이드로부터 지방산을 유리시켜 자유지방산을 생성하는 가수분해(hydrolysis)를 촉매하거나, 에틸 및 메틸알코올 존재하에서 메틸 및 에틸기를 제공하여 에틸 및 메틸에스터를 생성하는 alcoholysis 반응을 촉매하기도 한다. 후자의 경우 최근 바이오디젤(biodiesel)과 관련하여 많은 적용 및 연구사례를 보이고 있다.

리파아제는 그 외에도 트리글리세라이드와 자유지방산, 또는 에틸에스터 등과 반응하여 트리글리세라이드의 지방산 조성을 변경하는 일종의 Modified Triglyceride, 또는 Structured Triglyceride 를 제조하는 데 사용된다. 이러한 기술은 효소적 반응공정을 통하여 포화지방산의 양을 증가시켜 유지의 경도(hardness)를 증가시켜 화장품 등의 산업에서 이용된다. 또한 최근에는 트랜스지방산의 유해성 논란과 더불어 천연적 포화지방산을 증가시킨 유지들이 산업적 용도로 주목받고 있다. 이러한 유지들은 그 목적에 따라 지방산의 조성을 변경시켜 그 기능성을 증가시킨 예라고 할 수 있겠다.

리파아제는 Triglyceride 를 주요 기질로 삼고 있으며, 위치 특이적 반응 성질을 지니고 있어 그에 따라 1,3-specific(e.g. Lipozyme), non-specific(e.g. novozyme 435) 으로 구분한다. 본연구에서는 1,3-specific 리파아제를 이용하였다.

리파아제는 Triglyceride 를 주요기질로 삼고 있지만, 인지질의 반응에도 참여할 수 있는 것으로 보고되고 있다(Peng et al., 2002).

인지질 분해효소, 즉 포스포리파아제(phospholipase)는 뱀의 독(venome)에서 발견된 phospholipase A2 를 시초로 하여 초기 연구들이 이루어졌으나, 돼지췌장에서 상업적인 phospholipase A2를 생산함에 따라 오늘날 가장 널리 이용되고 있는 phospholipase A2(PLA2)는 pancreatic phospholipase 이다. 더불어 sn-1 위치의 아실기를 분해할 수 있는 phospholipase A1(PLA1)도 생산되고 있다.

이렇게 다양한 효소들의 물리, 화학적 특성을 알아보고, 적합한 후보 효소 균을 고르기 위해 반응 적합성에 대한 스크리닝을 시행하였다.

실험에 앞서, 실험에 사용할 기질을 먼저 준비하였다. 각 기질은 사용하는

효소에 따라 각기 다른 반응 환경 조건이 필요하였기 때문에 Lipozyme 계열의 효소와 PLA1 효소를 사용하는 경우, PLA2 효소를 사용하는 경우에 따라 달리 만들어져야 했다. Lipozyme 계열 효소와 PLA1 효소는 수분의 영향으로 인한 가수 분해를 낮추기 위하여 인지질과 자유 지방산 형태의 DHA를 무수 헥산(Hexane, anhydrous)에 녹인 후, 유기 용매 하에서 반응을 시도하였다. 또한 장시간의 반응 실험 동안 기질의 산화를 막기 위하여 산화방지제를 첨가하였다. PLA2 효소를 사용하는 기질의 경우, 인지질과 DHA를 일정 비율로 섞은 후, 헥산(Hexane)에 녹여 교반 후, 감압 농축하였다. 그 후, 반응에 필요한 글리세롤을 첨가하여 기질과 글리세롤이 잘 섞이도록 교반한 후 사용하였다. 고정화된 효소인 Lipozyme TL IM, Lipozyme RM IM은 인지질 대비 무게비로 정량하여 반응에 사용하였고, Lipozyme TL 100L, Lecitase Ultra(PLA1)은 액상 상태의 효소 역시 무게비로 정량하여 사용하였다. Lecitase 10L(PLA2) 효소는 이온 강도에 영향을 크게 받기 때문에 염화칼슘(CaCl<sub>2</sub>)과 함께 증류수에 녹여 사용하였다. 반응은 10mL 유리 바이알에서 수행하였으며 기질과 효소가 충분히 혼합될 수 있는 속도를 유지하며 마그네틱 바(magnetic bar)를 이용하여 교반하였다. 모든 반응은 반응 시간 동안 질소(N<sub>2</sub> 99.99%) 가스 스파징(sparging) 하에 이루어지도록 하여 인지질과 DHA의 산화를 최대한 방지하였다. 각 온도, 시간, 기질의 종류, 효소의 종류, 효소의 양 등 여러 조건 인자를 비교 실험 하여 반응 조건의 최적화를 이루고자 하였다.

#### (가) 효소의 종류에 따른 치환 반응

반응에 사용한 기질의 양은 20mg PC와 자유 지방산 형태의 DHA 40mg을 사용하였다. 효소의 양은 기질인 인지질의 양 대비, 65%의 비율에 해당하는 양을 사용하였으며, 반응 시간은 24시간이며 반응 온도는 각 효소별 최적화 온도를 사용하였다. Lipozyme 계열의 효소는 기질을 무수 헥산(anhydrous)에 녹여 유기 용매 하에서 이루어졌으며, Lecitase 계열의 효소는 전체 기질 양의 20배에 해당하는 글리세롤과 혼합하여 실험하였다.

#### (나) 수분 함량에 따른 치환 반응

실험에 사용한 기질의 종류는 표준물질 PC와 자유 지방산 형태의 DHA이며, 기질의 양은 PC 10mg과 DHA 20mg으로 몰 비율은 1대 5이다. 사용한 글리세롤의 양은 0.55g이며 이를 혼합한 혼합액 상태의 기질에 효소 용액을 첨가하여 반응하였다. 효소 용액은 염화칼슘과 PLA2 효소인 Lecitase 10L과 증류수의 혼합액이다. 기질인 PC양의 100%에 해당하는 10mg의



Lecitase 10L과 0.3mg의 염화칼슘을 포함한 증류수 혼합 용액을 각각 20  $\mu\text{l}$ , 40  $\mu\text{l}$ , 60  $\mu\text{l}$ , 80  $\mu\text{l}$ 씩 기질에 첨가하여 수분의 양에 따른 치환 반응율을 비교하였다. 반응 온도는 25°C이며 반응 시간은 24시간이다.

(다) 반응 온도에 따른 치환 반응

각 효소의 최적화 반응 온도는 효소의 공급업체인 Novozymes에서 제공한 최적화 온도 조건을 따랐으며 그것을 기준으로 하여 10°C의 간격으로 최적화 실험을 수행하였다. Lipozyme RM IM의 경우 최적화 온도가 50~70°C 이나, 고온에 의한 기질의 산화를 고려하여 70°C는 비교 대상에서 제외하고, 온도 비교 조건을 각각 40°C, 50°C, 60°C로 설정하여 실험하였다. 실험에 사용한 기질은 난황 인지질 GL-90E 20mg과 자유 지방산 형태의 DHA 80mg이며, 1 대 10의 몰 비율로 두 기질을 무수 헥산 1mL과 혼합하여 용해한 후, 인지질 대비 65%양의 효소를 넣어 반응하였다. 반응 시간은 24시간이다.

Leitase 10L의 경우, 온도 비교 조건은 각각 25°C, 35°C, 45°C로 정하였으며. 실험에 사용한 기질은 난황 PC와 자유 지방산 형태의 DHA다. 기질은 PC 20mg과 DHA 40mg을 헥산에 녹여 혼합한 후, 헥산을 감압 농축하여 두 기질을 혼합하였다. 그 후, 글리세롤 1.1g을 첨가하여 교반, 혼탁액을 만들었다. 이 혼탁액에 기질 대비 100%의 효소 양을 첨가한 후, 24시간 반응하였다. 효소는 0.6mg의 염화칼슘과 함께 120  $\mu\text{l}$ 의 증류수에 미리 녹여 준비한 후, 첨가하였고 수분의 함량은 선행된 수분 함량 최적화 실험의 결과를 적용한 비율에 따랐다.

(라) 반응 시간에 따른 치환 반응

반응 시간의 비교를 위하여 반응은 각각 24시간, 48시간, 72시간 84시간 동안 이루어졌다. Lipozyme RM IM의 경우, 반응 온도는 50°C이며 사용한 기질의 양은 난황 인지질 GL-90E 20mg과 자유 지방산 형태의 DHA 80mg이다. 효소는 인지질 양의 65%에 해당하는 양을 사용하였다. Lecitase 10L의 경우, 역시 같은 반응 시간 조건을 비교하였으며 반응 기질로 난황 PC와 자유 지방산 형태의 DHA를 사용하였다. 반응 온도는 35°C이며, 각 기질의 사용량은 PC 20mg과 DHA 40mg, 효소의 양은 PC의 양에 100%되는 양을 사용하였다.

(바) 효소의 양에 따른 치환 반응

효소의 양에 따른 치환 반응율의 차이를 비교하기 위하여 효소의 양을 각각 30%, 65%, 100%로 조절하여 실험하였다. Lipozyme RM IM을 이용한 반응의 경우, 반응 온도는 50℃이며 사용한 기질의 양은 난황 인지질 GL-90E 20mg과 자유 지방산 형태의 DHA 80mg이다. 실험은 48시간 동안 이루어졌다. Lecitase 10L의 경우, 역시 같은 조건 하에서 비교하였으며 반응 기질로 난황 PC와 자유 지방산 형태의 DHA를 사용하였다. 사용량은 PC 20mg과 DHA 40mg으로 몰 비율 1대 5의 비율이며, 반응 온도는 35℃, 반응 시간은 48시간이다.

(사) 기질의 종류에 따른 치환 반응 (DHA 형태 및 인지질의 종류)

① DHA의 형태에 따른 치환 반응

실험을 위하여 사용한 효소는 Lecitase 10L이며, 기질로 사용하는 DHA를 각각 에틸 에스테르 형태(DHA 50%)와 자유 지방산 형태(DHA 80%)로 나누어 비교하였으며 반응 기질로 난황 PC를 사용하였다. 사용량은 PC 20mg과 각 형태의 DHA 40mg으로 몰 비율 1대 5의 비율이며, 반응 온도는 35℃이고 반응 시간은 24시간이다.

② 인지질의 종류에 따른 치환 반응

실험에 사용한 인지질의 종류는 크게 sn-2 위치의 지방산이 분리된 라이소 PC와 PC 형태로 구분하였다. 그리고 GL-90E를 사용하여 다른 형태의 인지질과 중성 지질이 소량 섞여있는 형태로 나누어 실험하였다. 실험을 위하여 사용한 효소는 Lecitase 10L이며, 사용량은 각 인지질 종류별로 20mg과 자유 지방산 형태의 DHA 40mg으로 몰 비율 1대 5의 비율이고 사용한 효소의 양은 인지질 양 대비 100%이며, 반응 온도는 35℃, 반응 시간은 48시간이다.

(아) 기질의 양에 따른 치환 반응

실험에 사용한 효소는 Lipozyme RM IM이며 반응 온도는 50℃이며 사용한 기질의 양은 난황 인지질 GL-90E 20mg과 자유 지방산 형태의 DHA 각각 80mg과 120mg이다. 몰 비율은 전자는 약 1대 10, 후자는 약 1대 15로 반응은 무수 헥산에 녹여 이루어졌으며, 반응에 사용한 효소의 양은 인지질의 기질 대비 65%이다.

(자) water mimics 사용에 따른 치환 반응

실험에 사용한 효소는 Lipozyme RM IM이며 반응 온도는 50℃이며 사용

한 기질의 양은 난황 인지질 GL-90E 20mg과 자유 지방산 형태의 DHA 80mg이다. 반응은 무수 헥산에 녹여 이루어졌으며, 반응에 사용한 효소의 양은 인지질의 기질 대비 65%이다. propylene glycol 0.5 $\mu$ l를 반응에 사용하였으며, 반응에 앞서 propylene glycol과 기질의 혼합을 위하여 초음파 세척기에 10분간 방치하였다.

## (2) 고정화 PLA<sub>2</sub> 를 이용한 고도불포화지방산 강화 인지질의 효소적 합성

Phospholipase A를 이용하여 치환반응을 유도하고자 할 경우 상업화된 고정화 효소가 없으므로 해서 실험에 어려움을 겪는다. 특히 PLA<sub>2</sub>의 경우 반응에 CaCl<sub>2</sub> 와 같은 2가 금속이온이 존재하여야 한다는 특징 들로 인해 고정화를 통한 치환반응이 성공적으로 보고된 바가 거의 없다. 또한 반응의 특성상 가수분해를 억제하기 위해 유기용매만을 사용하거나, 최소한의 수분 함량을 유지해야 하기 때문에 Lipase 를 활용한 반응 시도가 주로 연구되고 있다.

본 연구팀은 PLA<sub>2</sub> 를 다양한 지지체 - alginate gel bead, silica gel, chitosan bead 등 - 에 공유결합, 가교화, 포괄법 등 다양한 방법을 사용하여 고정화 하거나, CLEAs 와 같은 carrier-free 형태의 고정화 방법 등도 시도하여 적절한 후보 방법을 스크리닝 하였다.

인지질로부터 지방산 1개를 분해한 라이소인지질을 생성하기 위한 반응은 pH 버퍼 단일계, 또는 pH 버퍼-에탄올 2상계 시스템 상에서 CaCl<sub>2</sub>를 cofactor 로 첨가하여 원활히 진행된다. 일반적으로 효소반응에서 고려될 수 있는 열전달 및 물질전달 등에 관련된 문제가 발생하지 않으며, 매우 안정적이고 신속하게 반응이 이루어지므로 대개 약 6시간 내에 90% 이상의 반응이 종료된다.

그러나, transesterification 반응의 경우 기질이 모두 유지(지방산, 인지질)로 구성되어 있으며 반응 시스템 중의 수분 함량이 1% ~ 10% 범위 내에서 조절되어야 하므로 고정화 지지체의 표면에서 diffusion 효율이 극도로 감소할 수 있으며, alginate gel bead 의 경우 대표적인 hydrogel 이므로 부분적인 가수분해만 발생할 수 있다. 따라서 가장 바람직한 방법은 지지체의 표면에 효과적으로 효소를 고정화하는 것이라고 짐작할 수 있다. 이에 따라 silica gel, 또는 이온교환레진 등의 표면에 효소를 고정화 하는 방법이 모색될 수 있겠다.

본 연구팀은 silica gel 표면에 효소간 가교결합을 유도하고 동시에 silica gel 표면과의 공유결합을 유도하는 고정화 방법을 이용하여 기존의 공유결합 법, 또는 가교법에 비해 대폭 간소화되고, 효율적인 고정화 방법을 고안

하여 PLA2의 아실기치환반응을 수행하였다.

표 2 고정화 방법에 따른 PLA2의 고정화 결과 비교

Carrier	immobilization method	immobilization yield <sup>(a)</sup>
Ca-alginate gel bead	entrapment	64%
Alginate-silicate sol-gel matrix	entrapment	61%
Celite	Adsorption	-
non-porous silica	cavalent binding	42%
non-porous silica	Crosslinking+ covalent binding	93%
none	CLEAs	59%

(a) : immobilization yield calculated based upon the highest result of hydrolytic activity after immobilization of PLA<sub>2</sub> ; substrate : GL-90E

표2 에 나타난 것처럼, non-porous silica 에 crosslinking과 covalent binding 을 혼합한 방법이 매우 높은 활성을 보여주고 있어 최종적으로 고정화 Lipase 와 비교할 수 있는 방법으로 제시되었다.

GL-90E(난황레시틴, 인지질 90% 이상) 500mg 을 기질로 하여 DHA지방산(DHA-fatty acids 80% 이상)을 1.5g, 3g 각각 비교하였으며 수분함량을 1%, 1.5%, 2%, 3% 로 달리하여 실험을 수행하였으며, 수분함량을 유지하는 데 있어 CaCl<sub>2</sub> 를 첨가하여 Ca<sup>2+</sup> 의 존재에 따른 효과를 측정하였다. 고정화 PLA<sub>2</sub> 는 첨가된 인지질의 30 wt% 를 추가하였다.

모든 반응은 50 조건에서 24시간 동안 magnetic stirrer 를 이용하여 10ml 실험용 바이알에서 수행하였다. 질소충진은 별도로 수행하지 않았다. 실험이 종료된 반응물은 Petroleum ether, Acetone 을 이용하여 인지질만을 침전 유도하여 지방산 조성을 분석하였다.

#### (4) 반응물의 정제

##### (가) 아세톤 정제

일반적으로 인지질의 회수를 이용하여 가장 보편적으로 사용되는 방법이다. 지질 내의 인지질의 정량 분석에도 이 방법이 사용되며 아세톤 특유의 화학

적 성질에 따라서 저온 상태에서 인지질이 녹지 않고 침전되는 점을 이용한 분리법이다. 실험 재료 및 방법은 이미 분석 방법에서 소개한 바 있고, 이 과정을 따라 인지질을 분리하였다. 그러나 이 방법의 경우, 분리에 사용되는 용매인 아세톤의 사용량이 많았으며, 규모가 커질수록 저온에 보관하는 시간이 길어졌다. 또한 아세톤의 온도가 충분히 내려가 있지 않을 경우, 지질 내의 인지질을 모두 수거하는 데 어려움이 따랐다. 그리고 사용하는 지방산의 비율이 인지질의 비율에 비하여 크기 때문에 대량의 아세톤 혼합물을 원심 분리해야 하는 어려움이 따랐다. 더불어 보다 정확한 분리를 위해서는 일련의 동일한 과정을 두 번 이상 반복해야만 했다. 아세톤 불용물 침전법을 2회 시행한 경우, 라이소 인지질로 가수 분해한 인지질을 포함한 전체 인지질이 95% 회수되었다.

#### (나) 초임계 이산화탄소 추출

초임계 유체란 기존 용매와는 다른 형태의 특별한 용매라 할 수 있다. 일반적으로 초임계 상태란 모든 물질의 온도와 압력이 그 물질 고유의 임계점 이상일 때를 말하며, 이때의 물질 상태를 초임계 유체라 한다. 초임계 유체 상태의 물질은 표면 장력의 상호 작용을 잃게 되며 기체와 액체의 두 가지 특성을 동시에 소유하게 된다. 즉, 액체 상태의 용매와 같은 용해력을 가짐과 동시에, 기체 상태와 같은 유동성, 침투성, 용해성, 점도와 같은 특성을 지니게 된다. 초임계 유체의 밀도는 임계점 이후 기체와 같은 낮은 상태에서 액체와 같은 밀도가 높은 상태로 급격하게 변화하는데, 이러한 높은 밀도는 초임계 유체의 용매력을 결정짓는 주요 인자이다. 즉, 압력을 자유롭게 변화시켜 밀도의 변화를 쉽게 줄 수 있다는 점이 초임계 유체가 분리 공정에 있어서 가지는 유용성이다. 특히나 기질로 사용되는 에틸 에스테르 형태의 지방산이나 자유 지방산은 일반적으로 낮은 온도와 압력에서 추출 공정이 이루어지기 때문에 에너지 소모가 작은 편이다. 또한 초임계 유체로 사용한 이산화탄소는 무극성의 물질로 중성 지질의 추출에 탁월한 선택을 보이므로 인지질과 중성 지질의 분리에 높은 효율을 보이고 있다. 더불어 사용한 이산화탄소는 추출물인 중성 지질과 쉽게 분리하여 재사용할 수 있으며, 이산화탄소는 기존의 다른 유기 용매에 비하여 독성이 없다는 장점을 가지고 있다.

#### (5) 스케일 업

인지질 지방산 치환반응의 재현성을 확인하고, 공정 개발을 위한 주요변수들을 도출하고 최적화 하기 위해 수 ml 스케일의 랩 실험에서 500ml 스케일로의 스케일업 실험을 수행하였다.

재현성 및 조건 최적화를 위하여 총 10회의 실험을 수행하였으며, 매 실험의 반응물 규모는 500ml 규모로 제한하였으며, 50℃ 온도에서 48시간 동안 300rpm agitation 속도를 유지하면서 반응을 수행하였다.

스케일업 실험에 사용된 모든 효소는 고정화 PLA2 로써, Silica gel(평균 입도 100마이크론, non-porous)에 고정화된 형태로 사용하였다. 스케일업 실험의 과정은 다음과 같다.

- 1) 반응에 사용될 기질은 50% 에탄올 솔루션 상태의 인지질과 지방산을 가온 상태에서 혼합한 다음, 혼화 상태가 균질화 되었을 때 감압농축하여 용매를 제거한다.
- 2) 1리터 3구 플라스크형 반응기에 500ml 의 반응 기질(인지질, DHA지방산 혼합물) 및 인지질 중량 기준 30% 의 고정화 PLA2 를 첨가한다.
- 3) Water bath에서 가온하며 48시간 반응을 진행한다.
- 4) 반응이 종료된 반응 혼합물은 200mesh wire mesh filter 를 통해 여과하여 고정화 PLA2 를 거른다.
- 5) 분석을 위하여 10ml 의 샘플을 취한다음 여액은 초입계 CO2 추출기 내에 200ml 씩 칭량하여 부은 다음 가압하에서 3시간 동안 자유지방산을 추출하고, 인지질을 회수한다.

## 다. 분석 방법

### (1) 인지질 분석

#### (가) 인지질의 함량

인지질의 함량은 시료 내에 인을 함유한 지질의 양이 얼마나 되는지 정량적 (wt. %)으로 검사하는 것을 이른다.

본 연구에서는 식품첨가물공전 및 건강기능식품공전에 등재되어 있는 ‘아세트 침전법’을 준용하였다. 분석 과정 및 특징은 다음과 같다.

#### (나) 인지질의 조성

인지질은 단일의 지질 조성물이 아닌, 복합지질로써 기능기라 할 수 있는 head group에 결합된 물질의 종류에 따라 다양한 프로파일을 가지게 된다. 이때의 head group에는 콜린(choline), 에탄올아민(ethanolamine), 세린 (serine), 이노시톨(inositol) 등이 올 수 있다. 따라서, 인지질은 총 인지질 함량 외에 인지질의 각 조성을 분류하여 분석할 수 있는 데 정량적, 정성적 분석으로 나뉜다.

#### ① 정량적 분석

대표적인 정량적 분석은 HPLC(High performance liquid chromatography)를 이용하여 순상, 또는 역상방식을 이용하여 분석할 수 있다.

HPLC와 병행하여 사용될 수 있는 검출기(detector)에는 UV, RI, ELSD 방식이 있는데 아실기의 지방산 조성에 의한 영향력이 다소 적다고 할 수 있는 ELSD(Evaporative light scattering detector)가 주로 이용되고 있다.

본 연구에서 사용하고 있는 분석과정 및 시약, 기기, 컬럼 등의 정보는 표3.와 같다.

표 3. 인지질 분석을 위한 HPLC 조건

HPLC system	Waters 600 series with ELSD (Alltech)
Column	Alltima HP silica column, 10cm length x 4.6mm O.D of column body particle size : 3um
Solvent A	Chloroform : Methanol : Ammonium hydroxide (80:19.5:0.5, v/v/v)
Solvent B	Chloroform : Methanol : Water : Ammonium hydroxide (60:34:5.5:0.5, v/v/v/v)
Flow rate of eluent	1.0 ml/min
Eluent gradient program	0-20 min : linear from A/B, 75/25 to 100% B, 20-31 min : hold 100% B, 31-35 min : 100% B to A/B, 75/25 and column regeneration for 5 min before next injection

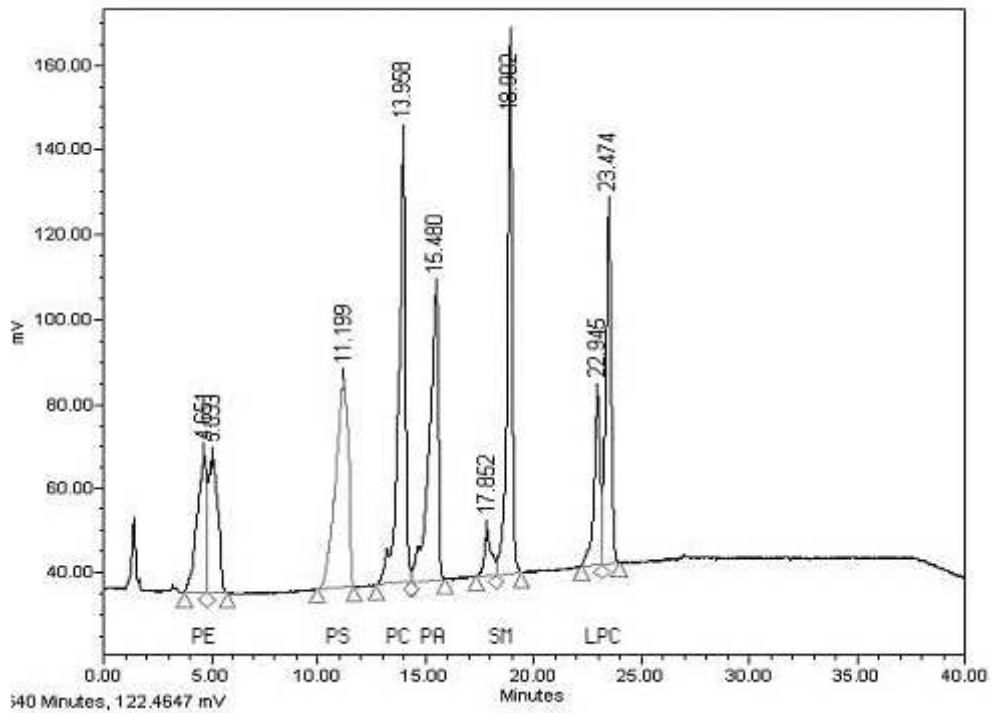


그림 3. 인지질 표준물질의 크로마토그램(HPLC)



## ② 정성적 분석

인지질의 조성을 분석하기 위해 HPLC/ELSD 를 이용할 경우 전처리 및 분석에 상당한 시간과 노력이 필요하다. 따라서, 신속하게 경향을 파악할 수 있는 정성적 분석 방법이 요구된다.

인지질의 정성적 분석에 가장 널리 이용되는 방법은

박층크로마토그래피(Thin Layer Chromatography)로써 전처리가 거의 필요없으며, 1,000 ppm 이하의 농도에서도 검출되는 민감도를 가지고 있어 매우 유용하게 이용될 수 있다.

본 연구에서 인지질 조성의 정성적 분석을 위해 사용한 TLC분석법은 표4 과 같다.

표 4 인지질 조성 분석을 위한 TLC 분석법

Developing solution	Chloroform:Methanol:Water (65:25:4, v/v/v)
Developing plate	silica gel coated aluminum plate for TLC, Merck
Preparative sample solution	chloroform or hexane solution ranging 1,000 ~ 2,000 ppm
Operation step	1)prepare lipid sample at around 1,000 ppm 2)prepare silica gel plate for analysis and activate on a hot plate by hitting for 1 min at 200℃ 3)spot the sample on the plate 4)develop in a developing container by dipping into the developing solution, and wait for 20 min 5)after allowing to develop as long as 7 cm from the origin, dry up the plate 6)expose the plate and develop the spot to identify in iodine vapor tank

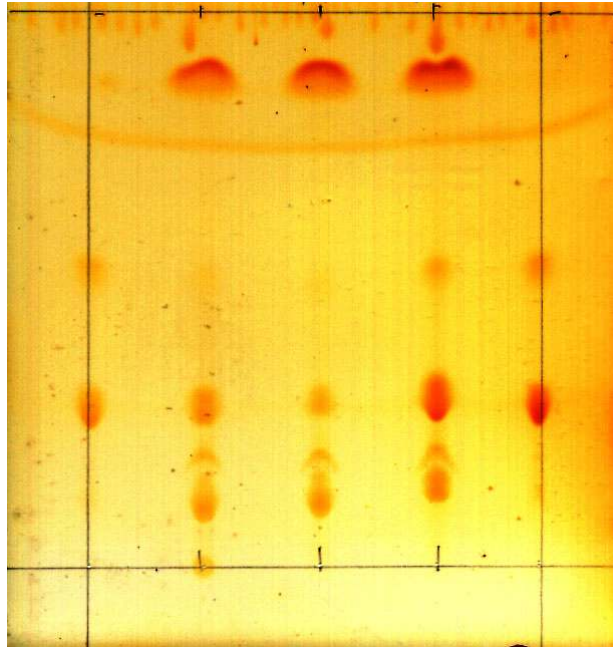


그림 4 phospholipids analyzed by TLC method, lane 1 and 4 refer to standard egg phospholipids, land 2,3,4 refer to hydrolyzed egg phospholipids.

## (2) 지방산 분석

지방산(fatty acid) 분석은 지질 샘플을 0.5N 수산화나트륨 메탄올 용액 및 BF<sub>3</sub>(Boron trifluoride) 메탄올 용액 상에서 methyl esterification 을 수행하여 글리세롤 골격에 아실결합하고 있는 각 지방산을 methyl ester 로 변환하는 유도체화 과정을 거치게 된다.

이렇게 유도체화 된 지방산은 극성 고정상(polyethylene glycol)이 도포되어 있는 모세관 컬럼을 통과하여 끓는 점의 차이에 따라 이동상인 carrier gas 를 통해 용출된다. 용출된 각각의 성분들은 ignitor에서 모두 연소되게 되며 이때 방출되는 전자의 강도를 검출기를 통해 검사하여 시각적 크로마토그램으로 보여주는 GC-FID(Gas Chromatography - Flame Ionization Detector)를 이용하여 분석한다.

본 연구에 사용된 GC-FID 기기 및 분석조건은 다음의 표5 와 같다.

表 5 GC operation condition for analysis of FAME(fatty acid methyl ester)

---

GC Device	HP5890
Detector	FID(Flame ionization detector)
Column	HP-INNOWAX, 30m length
Carrier gas	Helium (99.9999%)
Flow rate	1.5ml/min
Injector temp	270 °C
Detector	300 °C
Oven programming	50°C, 1min, 25°C/min to 200°C, 3°C/min to 230°C, 13min

---

### 3. 실험 결과 및 고찰

#### 가. 효소 스크리닝

##### (1) 효소의 종류에 따른 치환 반응

인지질의 지방산 치환 반응을 위하여 일차적으로 여러 종류의 효소를 탐색할 필요가 있었다. 본 연구에서 다루어진 효소는 총 5가지로 크게 Lipozyme과 Lecitase로 나누어 질 수 있다. Lipozyme의 경우 sn-1위치와 sn-3위치의 기질 특이성을 가지며 일반적으로 중성 지질의 치환 반응에 많이 쓰인다. 그러나 일부 연구 결과 인지질의 치환 반응에도 반응성을 보이며 더불어 반응 후, 인지질의 회수율이 Lecitase에 비하여 상대적으로 높기 때문에 본 연구에 도입하여 실험을 시행하였다. 사용된 효소는 고정화 상태의 효소와 액상 효소를 사용하였으며, 고정화 효소로는 Lipozyme TL IM, Lipozyme RM IM을 사용하였으며, 액상 효소로는 Lipozyme TL 100L을 사용하였다. Lecitase는 인지질에 기질 특이성을 보이는 효소로써 phospholipase A1 효소인 Lecitase Ultra와 phospholipase A2 효소인 Lecitase 10L을 사용하였다. 반응 실험 후, 일련의 전처리 과정을 거쳐 인지질의 회수율과 지방산의 결합률을 분석하였다.

그 결과 그림 4와 같이 Lipozyme TL IM이 가장 큰 반응성을 보였다. 그러나 인지질의 회수율이 상대적으로 매우 낮았는데, 이는 반응 도중 교반 속도와 소량의 수분에 의해서 Lipozyme TL IM의 고정체인 실리카겔이 깨지면서, 반응 후 효소와 인지질을 분리하는 과정 중 인지질의 일부가 실리카겔에 흡착되었기 때문이다. 반면 Lipozyme RM IM은 Lipozyme TL IM과 비슷한 반응성을 보였으며, 인지질의 회수율 또한 높았다. Lipozyme TL 100L은 Lipozyme TL IM의 고정화 전 액상 효소로써 이론상으로는 비슷한 반응성을 보여야 하나 액상 효소의 단점 상, 기질과 충분히 섞이지 못하여 반응이 거의 일어나지 않았다. Lecitase Ultra의 경우, 매우 낮은 인지질 회수율과 지방산 결합률을 보였는데, 라이소 인지질의 생성이 컸던 것으로 보아 가수 분해가 활발히 일어난 것으로 보여 진다. 반면 치환 반응은 거의 일어나지 않았다. Lecitase 10L은 중간 정도의 반응성과 인지질 회수율을 보였기 때문에 반응 조건의 최적화를 통하여 반응율을 높이기로 하였다. 위의 결과에 따라 효소의 탐색 결과 Lipozyme RM IM과 Lecitase 10L, 두 가지 효소를 최적화 실험에 사용하기로 결정하였다.

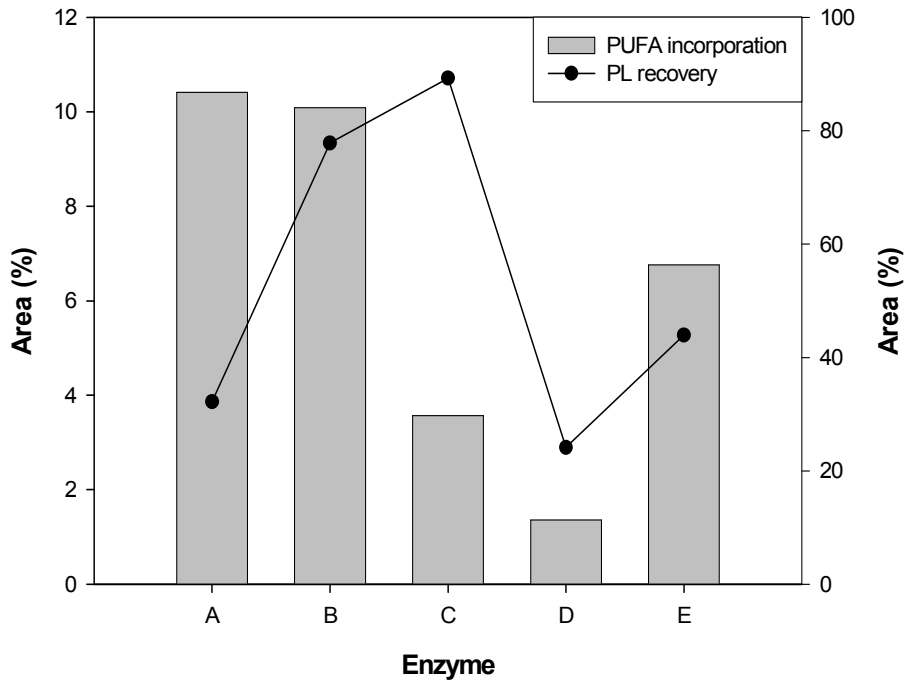


그림 5. 효소의 종류에 따른 치환 반응 결과

A:Lipozyme TL IM, B:Lipozyme RM IM, C:Lipozyme TL 100L, D:Lecitase Ultra, E:Lecitase 10L의 5가지 효소를 반응에 사용하였으며 사용량은 인지질 무게 대비 65%이다. 반응 온도는 Lipozyme 계열 효소는 50℃, Lecitase 계열 효소는 25℃이며 반응 시간은 24시간, Phosphatidylcholine / FF DHA의 기질 혼합 비율은 1/5 (mol/mol)이다.

(2) 수분 함량에 따른 치환 반응

치환 반응에서 가장 중요한 인자 부분이 수분의 함량이었다. 일반적으로 효소는 효소 반응 환경의 수분 함량에 따라 반응의 활성도가 달라지므로 반응에 활발히 참여할 수 있는 일정량의 수분이 요구된다. 따라서 가장 먼저 수분의 양에 따른 최적화 실험이 요구되었는데 이를 위하여 수분의 함량별로 실험을 실시하였다. 실험 결과 수분의 함량이 60 $\mu$ l일 경우 가장 높은 PUFA 함량을 보였고, 인지질의 회수율 또한 가장 높았다. (그림 5) 또한 인지질의 회수율이 수분 함량이 증가할수록 감소하는 것으로 보아 가수 분해 반응이 활발하게 일어났음을 알 수 있었다. 일련의 실험 결과를 통하여 가수 분해 반응과 경쟁적인 반응 관계에 있는 치환 반응을 높이기 위한 조건으로 수분이 60 $\mu$ l인 경우가 가장 반응에 적합함을 알 수 있었다.

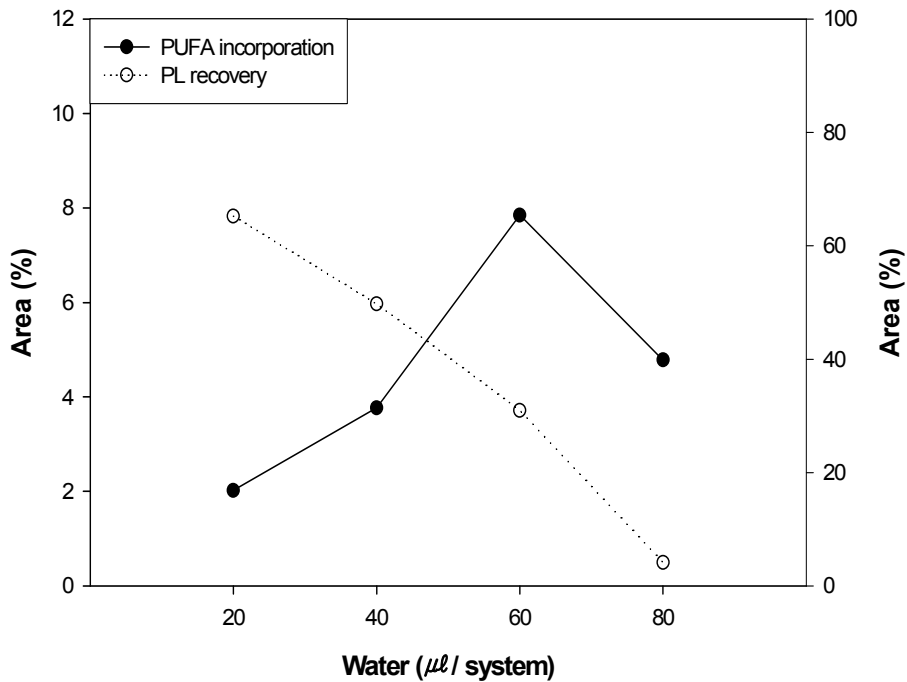


그림 6. 수분 함량에 따른 치환 반응 결과  
 사용한 효소는 Lecitase 10L이며, 사용량은 인지질 무게 대비 100%이다. 반응 온도는 25℃이며, 반응 시간은 24시간, Phosphatidylcholine / FF DHA의 기질 혼합 비율은 1/5 (mol/mol)이다.

### (3) 반응온도에 따른 치환 반응

효소 반응의 반응 환경 중, 온도 조건은 각 효소의 종류별로 특성화되어 있기 때문에 효소의 탐색 실험 과정에서 선정된 두 가지 효소인 Lipozyme RM IM과 Lecitase 10L를 각각 다른 온도 하에서 실험하였다. 실험 결과는 그림 6과 같이 반응 온도가 50℃ 일 때 가장 높은 치환 반응율을 보였으며, 60℃인 경우 오히려 반응율이 감소하였다. 인지질의 회수율에는 각 온도 모두 큰 차이를 보이지 않았다.

Lecitase 10L의 최적 온도 조건은 30~40℃로 Lipozyme 효소에 비해 상대적으로 낮은 온도 하에서 최적화 온도 실험이 진행되었다. 실험의 결과는 그림 7과 같이 반응 온도가 35℃ 경우 인지질에 결합한 PUFA의 함량이 가장 높았으며 인지질의 회수율은 다소 감소하는 경향을 보였으나 다른 온도 조건과 큰 차이를 보이지 않았다.

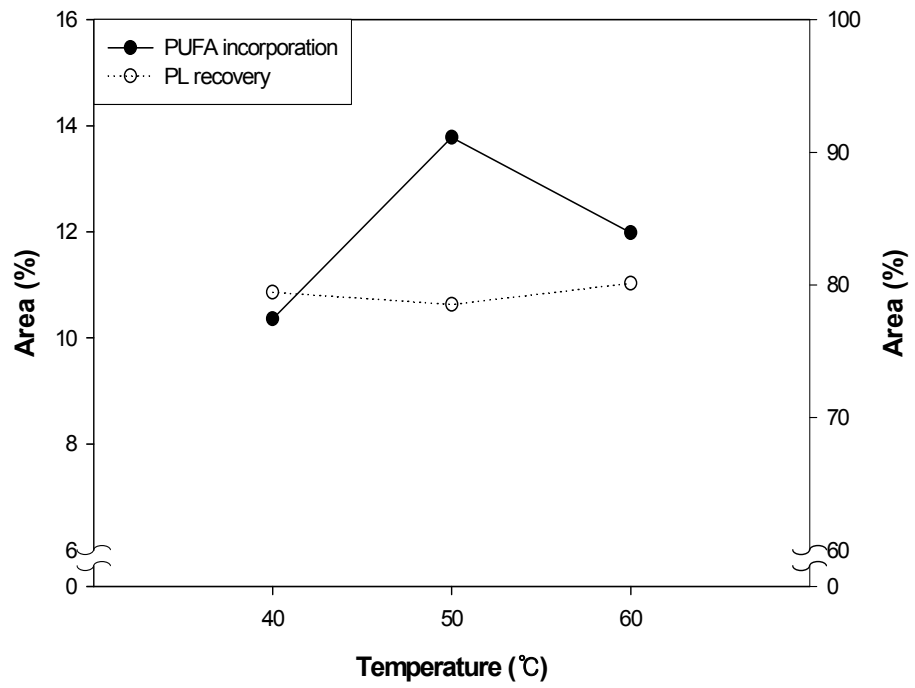


그림 6. 반응 온도에 따른 치환 반응 결과 1  
 사용한 효소는 Lipozyme RM IM이며, 사용량은 인지질 무게 대비 65%이다. 반응 시간은 24시간, GL-90E / FF DHA의 기질 혼합 비율은 1/10 (mol/mol)이다.

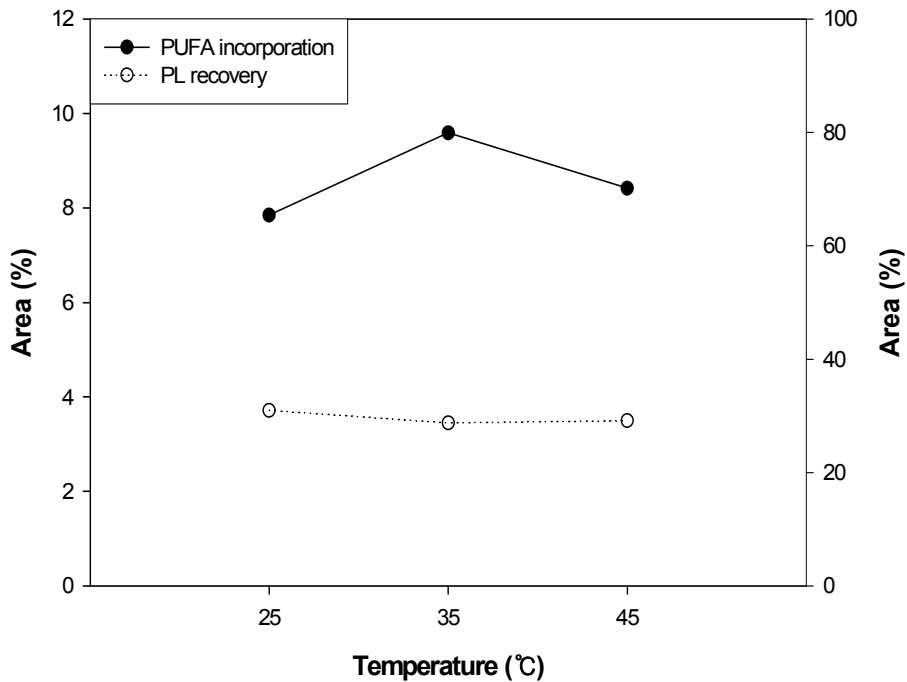


그림 7. 반응 온도에 따른 치환 반응 결과 2  
 사용한 효소는 Lecitase 10L이며, 사용량은 인지질 무게 대비 100%이다. 반응 시간은 24시간, Phosphatidylcholine / FF DHA의 기질 혼합 비율은 1/5 (mol/mol)이다.

#### (4) 반응 시간에 따른 치환 반응

효소의 반응 시간에 따른 치환 반응율과 인지질의 회수율과의 관계 및 반응을 최적화할 수 있는 적합한 반응 시간을 알아보기 위하여 각 시간별로 실험을 실시하였다. Lipozyme RM IM을 사용한 반응의 결과는 그림 8과 같이 반응 시간이 84시간일 때 대략 30%의 가장 높은 치환 반응율을 보였다. 그러나 인지질의 회수율은 상대적으로 낮은 55%에 달하였다. 반응 시간이 점차 길어짐에 따라 인지질의 회수율이 감소하는 경향을 보였는데, 이는 반응 시간이 길어질수록 효소의 가수 분해로 인하여 인지질이 라이소 인지질로 전환되었기 때문이다. Lecitase 10L을 사용한 경우, 그림 9의 결과에서 알 수 있듯이 가장 높은 치환 반응율을 보인 것은 84시간이었으며 약 25%의 치환 반응율을 보였다. 이때의 인지질의 회수율은 약 5% 정도로 대부분의 인지질이 라이소 인지질로 가수 분해된 것을 알 수 있었다. Lecitase 역시 Lipozyme과 마찬가지로 시간이 지남에 따라 가수 분해율이 증가하면서 인지질의 회수율이 떨어지는 것을 볼 수 있었다. 반면 지방산의 치환율은 점차 증가하였다. 그러나 상대적으로 Lecitase의 경우 Lipozyme에 비하여 매우 낮은 인지질 회수율을 보였다.



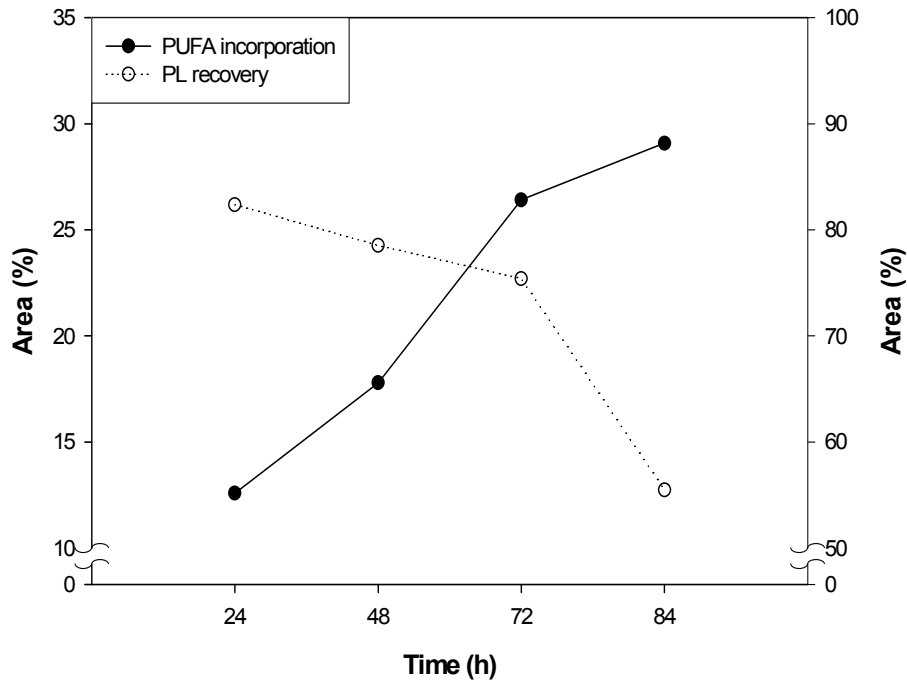


그림 9. 반응 시간에 따른 치환 반응 결과 1

사용한 효소는 Lipozyme RM IM이며, 사용량은 인지질 무게 대비 65%이다. 반응 온도는 50℃이며, GL-90E / FF DHA의 기질 혼합 비율은 1/10 (mol/mol)이다.

#### (5) 효소의 양에 따른 치환 반응

반응에 사용하는 효소의 양은 반응 공정이 상업화되었을 때, 제품의 생산 비용과 직결하는 문제임으로 반응을 충분히 일으킬 수 있는 동시에 경제성이 있어야 한다. 이론적으로 보았을 때, 효소의 양을 많이 사용할수록 반응율은 높아지며 전체 반응 시간은 짧아진다. 본 실험에서는 효소의 양에 따른 치환 반응율의 차이를 비교하였다. 그 결과 Lipozyme RM IM의 양이 증가할수록 치환 반응율이 높아졌으며 기질인 인지질 양 대비 100%의 효소를 사용하였을 경우, 약 30%의 치환 반응율을 보였다. 결론적으로 첨가된 Lipozyme RM IM의 양에 따라 치환 반응율의 변화가 컸으며, 이는 충분한 양의 효소가 반응에 필요하다는 것을 의미한다. 동시에 효소의 재사용 부분을 생각해야함을 의미한다. Lecitase 10L의 경우, 실험의 결과 Lecitase 10L의 양이 증가할수록 치환 반응율은 높아졌으며, 반면에 인지질의 회수율은 감소하였다. 또한 Lipozyme RM IM과 비교하였을 때, 전반적으로 치환율이나 인지질 회수율이 낮은 경향을 보였다. (그림 10, 11)

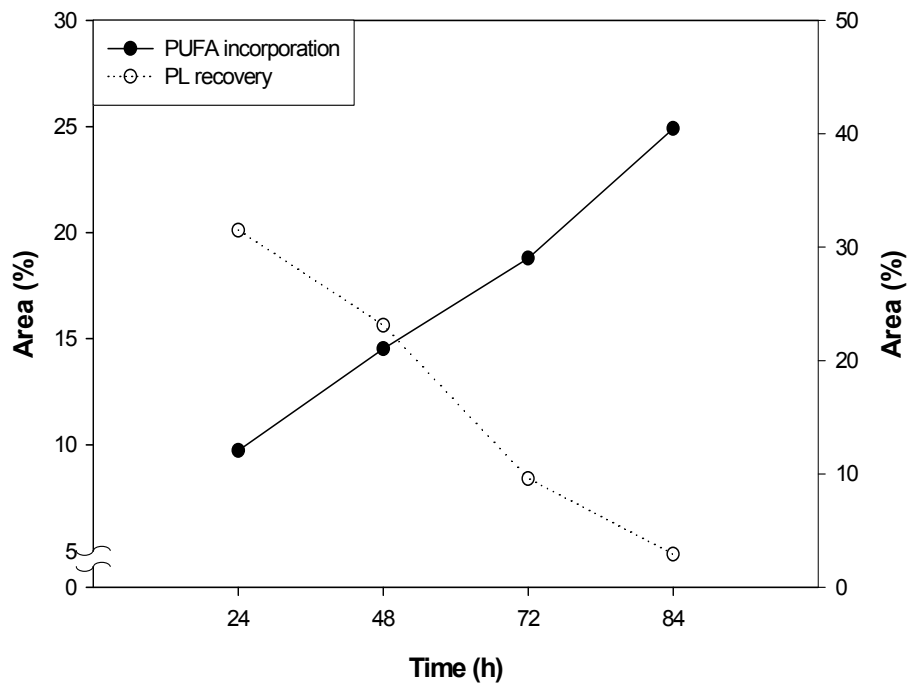


그림 10. 반응 시간에 따른 치환 반응 결과 2  
 사용한 효소는 Lecitase 10L이며, 사용량은 인지질 무게 대비 100%이다. 반응 온도는 35℃이며, Phosphatidylcholine / FF DHA의 기질 혼합 비율은 1/5 (mol/mol)이다.

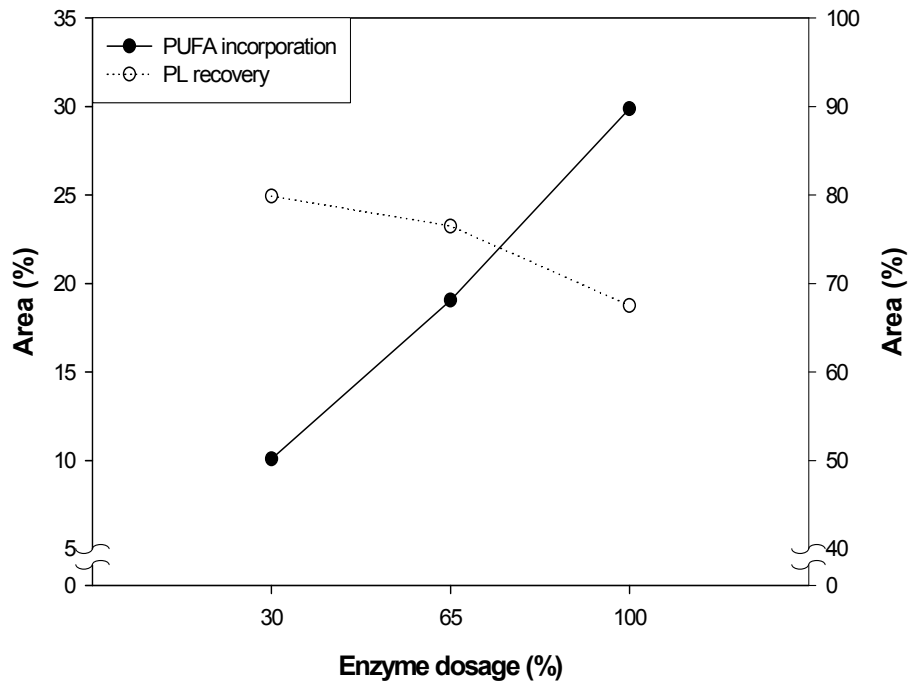


그림 11. 효소 양에 따른 치환 반응 결과 1

사용한 효소는 Lipozyme RM IM이다. 반응 온도는 50℃이며, 반응 시간은 48시간, GL-90E / FF DHA의 기질 혼합 비율은 1/10 (mol/mol)이다.

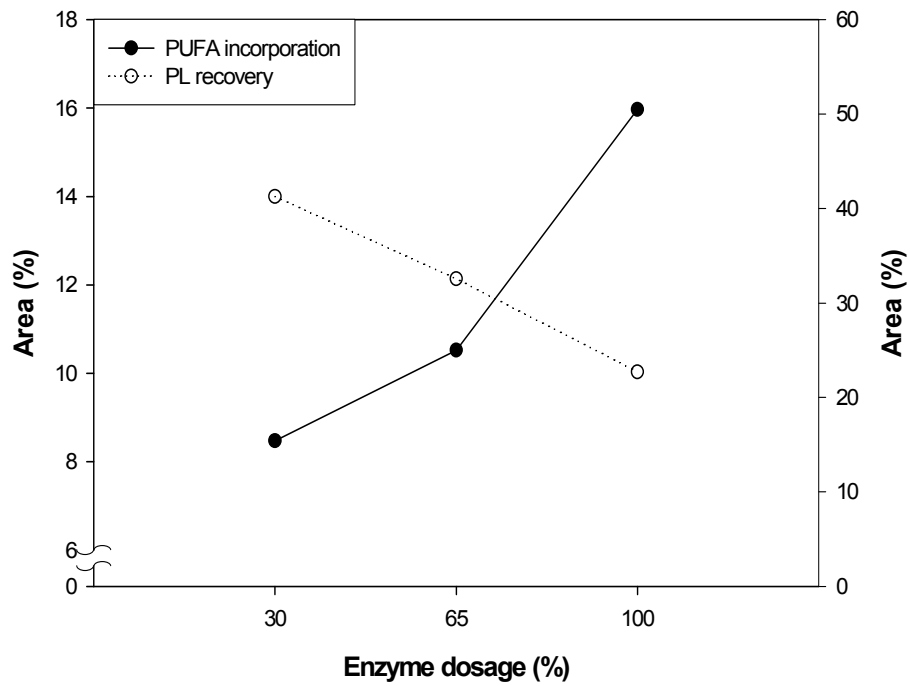


그림 12. 효소 양에 따른 치환 반응 결과 2

사용한 효소는 Lecitase 10L이다. 반응 온도는 35℃이며, 반응 시간은 24시간, Phosphatidylcholine / FF DHA의 기질 혼합 비율은 1/5 (mol/mol)이다.

(6) 기질의 종류에 따른 치환 반응 (DHA 형태 및 인지질의 종류)

반응에 쓰이는 기질의 종류에 따라 치환 반응이 어떻게 달라지는 지 알아보기 위하여 실험을 수행하였다. 일차적으로 DHA의 형태에 따른 반응의 차이를 비교하였고, 인지질의 종류에 따른 반응율의 차이점을 알아보았다.

● DHA의 형태에 따른 치환 반응

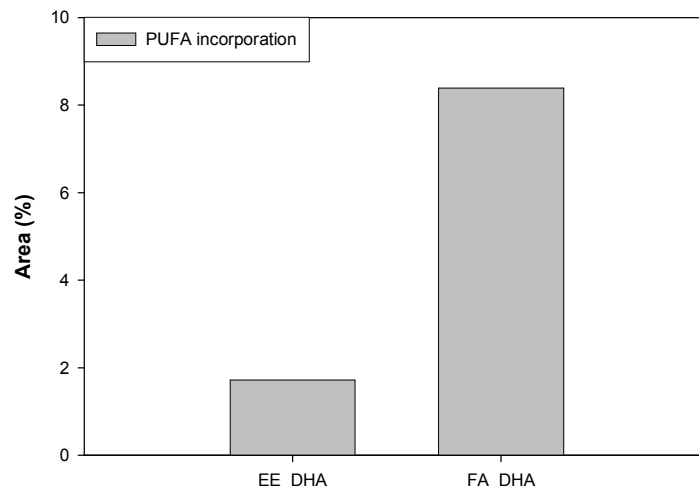


그림 13. DHA의 형태에 따른 치환 반응 결과

사용한 효소는 Lecitase 10L이며, 사용량은 인지질 무게 대비 100%이다. 반응 온도는 35℃이며, 반응 시간은 24시간, Phosphatidylcholine / FF DHA의 기질 혼합 비율은 1/5 (mol/mol)이다. 사용한 기질은 ethyl ester 형태의 DHA와 자유 지방산 형태의 DHA이며 순도는 50%이다.

자유 지방산 형태의 DHA의 경우 DHA가 80% 포함된 기질이였기 때문에 에틸 에스테르 형태의 DHA 기질과 순도를 맞추기 위하여 순도가 낮은 자유 지방산 형태의 DHA 오일을 사용하여 희석을 한 후, 반응 기질로 사용하였다. 효소의 양은 PC의 양에 100%되는 양을 사용하였다. 다음 그림 12의 결과와 같이 동일한 반응 조건 하에 자유 지방산 형태의 DHA를 사용한 경우, 약 8%의 치환율을 보인 반면, 에틸 에스테르 형태의 DHA의 경우, 약 2% 정도의 치환율을 보였다. 이는 에틸 에스테르 형태의 DHA가 반응에 참여하였을 때, 효소가 안정적인 에틸 에스테르 형태의 연결을 끊은 후, 다시 치환 반응에 참여해야하기 때문에 상대적으로 두 개의 반응에 놓여있는 상태가 되는 것이다. 따라서 자유 지방산 형태의 DHA보다 반응율이 떨어

졌다고 볼 수 있다.

● 인지질의 종류에 따른 치환 반응

실험 결과, 라이소 PC 형태의 기질을 사용한 경우, 20% 이상의 치환 반응율을 보였으나 인지질 회수율이 PC를 사용한 경우 보다 다소 낮았다. 이는 라이소 형태의 PC가 상대적으로 반응에 참여하기는 쉬운 형태라는 것을 보여준다. GL-90E의 경우 어느 정도의 반응율을 보였으나 PC에 비하여 낮은 반응율을 보였다. 이는 GL-90E의 기질 내에 있는 소량의 중성 지질이 인지질과의 치환 반응을 저해하였기 때문이라 여겨진다. (그림 13)

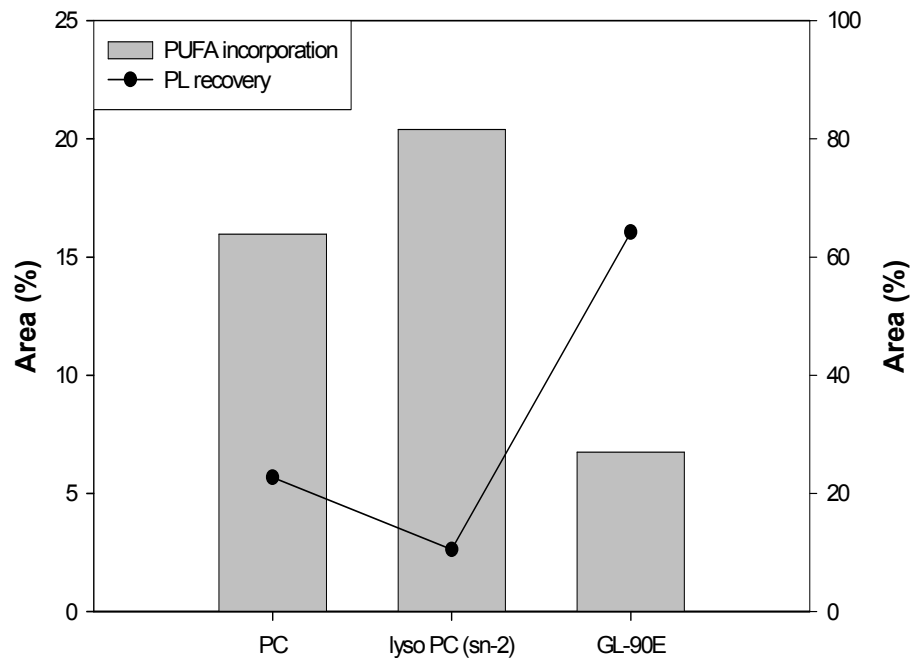


그림 14. 인지질의 종류에 따른 치환 반응 결과  
 사용한 효소는 Lecitase 10L이며, 사용량은 인지질 무게 대비 100%이다. 반응 온도는 35℃이며, 반응 시간은 48시간, Phosphatidylcholine / FF DHA의 기질 혼합 비율은 1/5 (mol/mol)이다.

(7) 기질의 양에 따른 치환 반응

기질로 사용하는 DHA의 양에 따른 치환 반응율을 알아보기 위하여 DHA의 비율을 다르게 하여 실험하였다. 그림 14의 결과와 같이 반응에 참여하는 DHA의 양이 증가한 경우, 치환 반응율이 증가하였으며 또한 인지질의 회수율도 증가하였다.

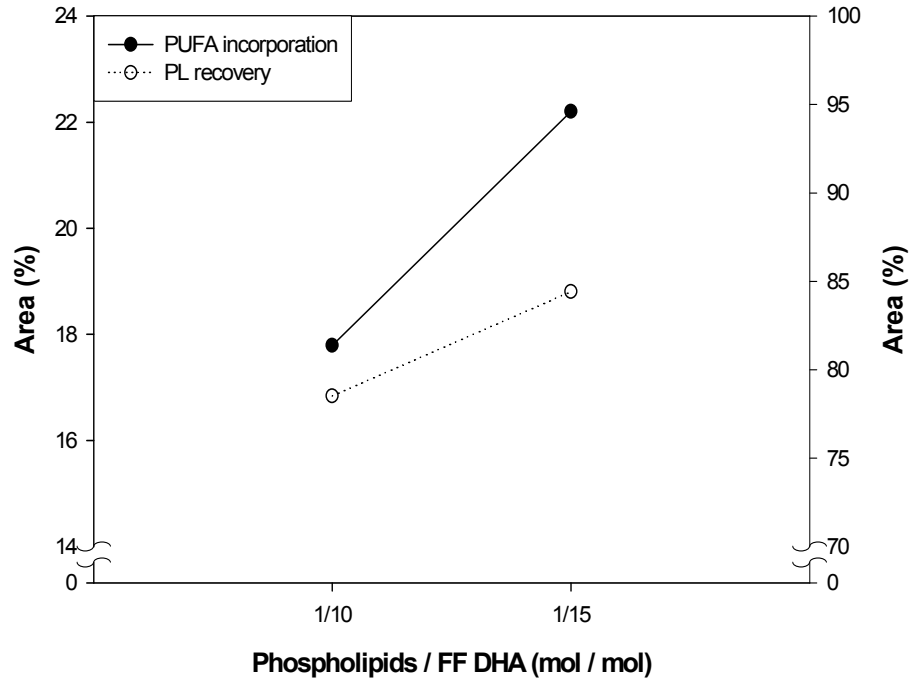


그림 15. 기질의 양에 따른 치환 반응 결과  
사용한 효소는 Lipozyme RM IM이며, 사용량은 인지질 무게 대비 65%이다. 반응 온도는 50℃이며, 반응 시간은 48시간이다.

(8) water mimics 사용에 따른 치환 반응

water mimics는 효소 반응 시, 물과 비슷한 성질로서 반응의 활성을 높여 주는 역할을 한다. 일반적으로 에틸렌 글라이콜(ethylene glycol) 또는 프로필렌 글라이콜(propylene glycol)이 water mimics로 사용되며, 반응의 활성을 도우나 많은 양을 사용할 경우, 가수 분해 반응을 높여 인지질의 회수율을 떨어뜨리는 단점을 가지고 있다. 이 실험에서는 propylene glycol의 사용 유무에 따른 치환 반응율을 살펴보았다. 실험의 결과 인지질의 회수율에는 큰 차이를 보이지 않았으나 propylene glycol을 사용한 경우, 치환 반응율이 높아짐을 볼 수 있었다. (그림 15)

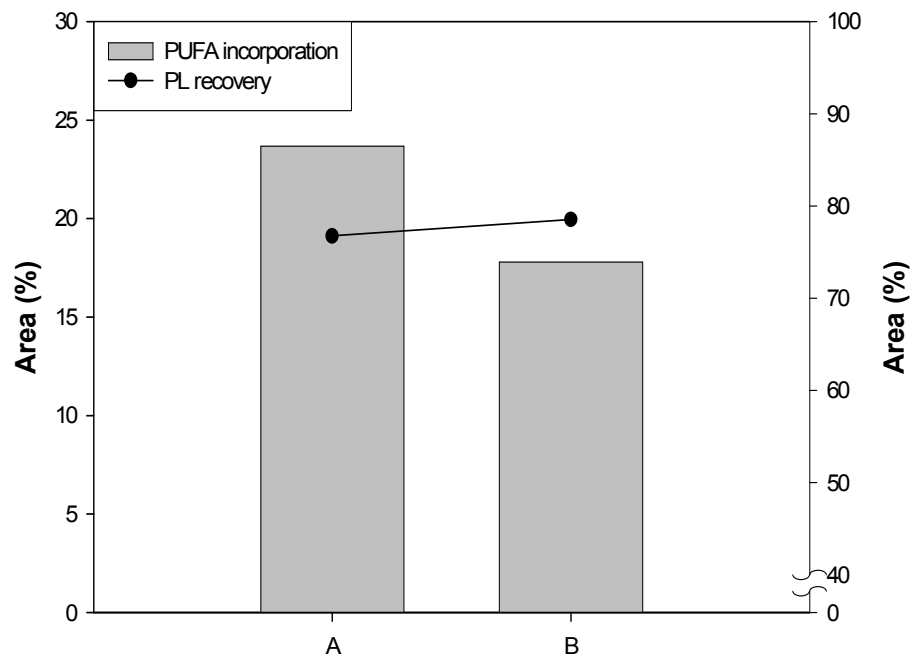


그림 16. water mimics 사용에 따른 치환 반응 결과

A: propylene glycol  $0.5\mu\text{l}$  사용, B: 사용 안함. 반응에 참여한 효소는 Lipozyme RM IM이며, 사용량은 인지질 무게 대비 65%이다. 반응 온도는  $50^{\circ}\text{C}$ 이며, 반응 시간은 48시간, GL-90E / FF DHA의 기질 혼합 비율은 1/10 (mol/mol)이다.



## 다. 고정화 PLA2를 이용한 고도불포화지방산 강화 인지질의 효소적 합성

고정화 PLA2 를 이용한 실험을 통해 리파아제와 또 다른 형태의 반응특성을 규명할 수 있었다.

Lipozyme RM IM 의 경우 매우 안정되고 강한 활성을 보여주는 대표적인 Lipase 로써의 이용 가능성이 엿보인다. 가장 비슷하다고 할 수 있는 Lipozyme TL IM 의 경우 Xuebing(2002) 등의 연구결과에서 Lipozyme RM IM 에 대별되는 가능성을 보여주었으나 지지체의 물리적 견고성이 부족하여 전체적인 활용가능성이 미흡하다. 그러나, 상대적으로 저렴한 가격(Lipozyme RM IM 의 20% 수준)은 장점으로 남아있다.

본 연구에서 사용된 Lipozyme RM IM 은 이온교환레진에 adsorption 방식으로 미생물 유래의 Lipase 를 고정화 한 것으로 매우 안정된 활성을 보여준다.

반면 PLA2 의 경우 수분함량 등에 매우 민감하며, CaCl<sub>2</sub>의 존재 여부가 활성에 영향을 줄 수 있음을 확인할 수 있었다.

표 6. 반응 후 인지질 내 DHA 함량 (CaCl<sub>2</sub> 무첨가 군)

		수분함량(water 중량/반응물 중량, CaCl <sub>2</sub> 무첨가)			
		1.0 %	1.5%	2%	3%
DHA/인지질	5배	0.5%	12.6 %	10.5%	0.4%
물비율	10배	0.4%	18.1 %	16.2%	0.3%

표 7. 반응 후 인지질 내 DHA 함량 (CaCl<sub>2</sub> 첨가 군)

		수분함량(water 중량/반응물 중량, CaCl <sub>2</sub> 100mM)			
		1.0 %	1.5%	2%	3%
DHA/인지질	5배	0.6%	30.4 %	18.0%	0.1%
물비율	10배	0.4%	30.5 %	19.2%	0.1%

표 6 과 표 7에서 보여지는 것처럼 DHA의 양은 크게 영향을 미치지 못했다. 반면 수분함량과 CaCl<sub>2</sub> 는 PLA2 고정화 효소의 활성에 큰 영향을 미치는 것으로 나타났다.

## 라. 반응물의 정제

효소 반응 실험이 끝난 상태의 반응물인 인지질과 자유 지방산 DHA 혼합물 100mL을 에탄올 100mL을 사용하여 용해한 후, 여과하여 효소와 분리하였다. 분리한 혼합물 에탄올 용액 200mL을 추출기에 넣었다. 추출기의 뚜껑을 봉한 후, 추출기의 온도를 45℃, 압력을 16MPa로 가온 가압하였다. 한 개의 분리기를 사용하였으며 추출기에서 분리기로 나누어지는 부분에 압력조절장치를 사용하여 압력을 4MPa로 감압하였다. 분리기의 온도는 추출 시간동안 30℃를 유지하였으며, 추출기에 초임계 상태의 이산화탄소를 시간당 1.6L의 비율로 흐르게 하여 지방산을 추출하였다.



그림 17. 인지질과 지방산의 분리 추출 공정에 사용된 랩용 초임계 플랜트

그림 18과 같이 총 추출에 소요된 시간은 90분이며, 추출을 시작한 지 약 30분, 이산화탄소의 유량이 약 900g이 되는 시점에서 전체 지방산의 50% 이상에 해당하는 양이 추출되었음을 확인 할 수 있었다. 더불어 대부분의 추출물이 60분 이내에 추출되었다. 추출 후, 라이소 인지질을 포함한 전체 인지질의 회수율은 약 98%에 달하였다. 이와 같이 초임계 이산화탄소 추출 공정을 통하여 별도의 용매 추출 공정 없이 짧은 시간 내에 효과적으로 인지질과 지방산을 분리할 수 있었다.

(3) 결과

그림 18 초임계 이산화탄소 추출 공정에 따른 추출물의 추출 곡선  
 추출기 압력은 16MPa이며 온도는 45℃, 분리기의 압력은 4MPa이며, 온  
 도는 30℃이다. 초임계 이산화탄소의 유량은 시간당 1.6L이다.

마. 스케일업

10회의 스케일업 테스트를 통해 랩스케일에서 확립된 최적화 조건의 재현  
 성을 검증해 보았다.

표 8. 고정화 PLA2 를 이용한 PL-PUFA 합성 스케일업 테스트 결과

구분	1차	2차	3차	4차	5차	6차	7차	8차	9차	10차
DHA %	18.1 %	20.5 %	28.1 %	27.1 %	29.2 %	30.8 %	28.5 %	26.7 %	28.3 %	29.8 %
인지질 회수율	90%	85%	91%	90%	85%	93%	90%	93%	87%	89%
반응 조건	50℃, 48시간, GL-90E 70g, Enzyme(immobilized) 20g DHA-FA(DHA80%) 420g Water addition 7.5g(with 100mM CaCl <sub>2</sub> )									

실험 결과 인지질 내 DHA함량은 평균 26.7%, 인지질 회수율은 평균 89%를 달성하였다. 초기 반응에서는 고정화 효소의 뭉침 현상 등을 고려하지 못한 점들이 발생하였다. 수분을 첨가할 때 고정화 효소를 미리 반응물에 적셔서 soaked 된 상태를 유지시킨 다음 수분을 따로 점적하여 첨가함으로써 30분 정도의 균질화를 위한 시간을 제공함으로써 자연스럽게 반응이 이루어지도록 유도하였다.

#### 4. 결론

기능성 인지질을 개발하기 위한 노력의 일환으로 인지질에 고도불포화지방산(PUFA)을 효소적 합성 과정을 통해 붙이는 연구 활동을 수행하였다.

특히 DHA는 오메가-3 계열 지방산의 대표적인 물질로써 CNS(중추신경계, Central neural system)의 시냅스를 구성하고, 망막의 로돕신 세포에 다량 함유되어 있어 생리활성과 관련한 다양한 기능을 보이고 있다.

특히 DHA가 분자적으로 인지질에 결합한 PL-PUFA의 경우 생체이용율(bioavailability)이 높고 기능식품 소재 등으로의 활용이 기대되고 있어 개발 필요성이 높다고 하겠다. 더불어 기존의 인지질 제품에 가치를 더하여 부가가치를 증대시킬 수 있는 기술이다.

본 연구를 통해 최종적으로 인지질 내 DHA를 30% 까지 상승시킴으로써 2~4% 수준의 DHA 함량을 10배 가량 높일 수 있었다.

Lipozyme 계열의 Lipase를 통한 합성을 초기에 시도하였으나, PLA2를 고정화 하는데 성공하여 수분함량이 2% 미만 수준의 비수계반응시스템 상에서 활성을 발휘하는 안정된 고정화 방법을 고안하였다.

고정화된 인지질분해효소는 고도 불포화 지방산의 결합을 유도할 수 있는 장점을 가질 뿐 아니라, Lysolecithin의 생산, Palmitic acid 등의 포화지방산을 결합하여 수중 분산성을 높일 수 있는 유화제 개발에도 기여할 수 있는 실용적 제품들을 개발, 상품화 할 수 있는 가능성을 열었다.

## 제 2 절 PLD 정제 및 특성

### 1. 연구 배경

Phospholipase D는 세포막에 존재하는 membrane-bound enzyme의 일종이라 할 수 있으며 그 형태는 Transmembrane protein의 형태('D' form)를 취하고 있다. Transmembrane protein 형태는 세포막의 소수성 부위 및 극성 부위와 모두 결합한 형태로 막 단백질 중에서도 추출이 힘든 것으로 알려져 있어 효소 추출 시 세포 파괴 전처리 과정으로 Homogenizer를 이용한 분쇄과정이 요구된다. PLD는 시금치, 당근, 양배추, 땅콩, 목화씨 등의 식물조직과 토끼 및 쥐, 돼지의 뇌조직 그리고 *Corynebacterium bovis*, *Streptomyces chromofuscus*, *porphyridium cruentum* 등의 미생물에 이르기까지 생물계에 널리 분포되어 있으며, 본 연구에서는 식물 유래의 효소를 국내에서 풍부하게 생산 및 거래되고 있는 양배추뿐만 아니라 배추 및 토마토 등의 국내 농산물에서의 효소 탐색 및 활성도를 측정하여 저렴하게 효소를 생산하고자 하였다. 그 결과 1차년도 연구개발 결과 다양한 녹색채소 중 가수분해 활성이 가장 좋았던 것이 국산배추 유래의 PLD임을 확인하였으며, 2차년도에 배추로부터 PLD를 추출하고, 이와 더불어 SDS-PAGE를 통한 분자량 확인과 UV/Vis spectrophotometer 또는 HPLC 등을 이용하여 분석할 수 있는 효소의 최적 활성도 및 반응 조건, 사용수명 등을 탐구하였다. 또한 이러한 국산배추 유래의 PLD를 대량으로 생산할 수 있는 추출 및 정제법을 개발하고자 하였다.

천연의 소재 및 원료 등을 이용하여 고품질, 고부가가치를 지닌 상품으로 개발, 적용함으로써 우리나라 농축산업계의 취약한 식품가공 기술력을 향상시키고 부가가치를 제고하여 부강한 농촌을 만드는 데 기여한다. 또한 기능성 농산물로부터 추출한 PLD 효소를 이용하여 고기능성 식품을 생산 및 유통 시킴으로써 국민건강 증진에 도움을 주고자 한다.

## 2. 연구 방법

### 가. 실험 재료

본 실험에 시료로 사용한 배추(chinese cabbage, *Brassica campestris* ssp *pekinensis*)는 국내산으로, 일상적인 농산물 시장에서 구입하고 세척하여 1차 분쇄 후에 실험재료로 사용하였다. 따라서 배추의 품질과 계절에 따라 효소의 정제 수율이 약간 다를 수 있지만 무시하고 사용하였다. 단백질 침전에 사용된 황산암모늄과 아세톤은 EP급을 사용하였으며, SAMCHUN으로부터 구입하였다. 활성 측정에 사용한 기질인 레시틴 (lecithin, phospholipids) 소재는 난황 포스파티딜콜린(약칭: PC, Egg- Phosphatidyl Choline 99% 시그마 알드리치 코리아(주)), 난황 라이소-포스파티딜콜린(약칭: LPC, Egg Lyso-Phosphatidyl Choline 98%, Avanti Polar Lipids, Inc.), 난황 인지질 (Egg-phospholipid 95%, (주)고센바이오텍, 상품명: GL-90E)를 사용하였다.

## 나. 실험 방법

### (1) PLD 조효소의 추출

PLD 조효소란 특정 소스로부터 추출된 단백질을 추가의 분리, 정제 과정을 거치지 않아 우리가 원하는 효소 이외에 다른 단백질이 섞여있는 상태를 말하며, 다음의 방법으로 추출하였다.

배추 시료와 시료의 1.5배에 해당하는 정제수를 혼합하여 Homomixer로 균질화한 다음 200mesh의 천으로 여과하고 여액을 4℃, 8000rpm으로 20분간 원심 분리하였다. 상등액을 55℃에서 5분간 열처리한 후 급랭시켜 8000rpm에서 다시 원심 분리하여 상등액을 얻었다. 이 상등액에 -20℃의 아세톤을 1/2배량 가하여 -20℃에서 하루 동안 단백질을 침전시킨 다음 다시 8000rpm으로 20분간 원심 분리하였다. 단백질 침전물에 잔존하는 아세톤을 질소가스 기류 하에서 날려 보낸 다음 동결 건조하여 조효소 분말을 만들었다. (그림 19) 분말무게의 100배에 해당하는 양의 증류수를 가하여 잘 교반한 후 원심 분리하여 상층액을 PLD 조효소 용액으로 사용하였다.

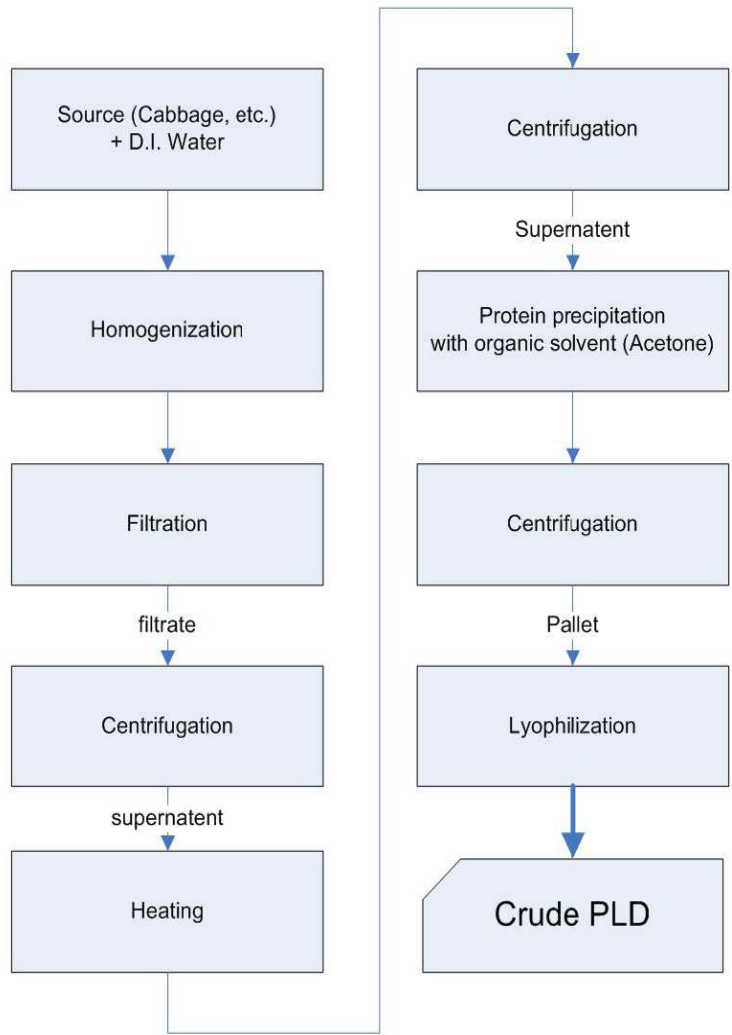


그림 19. 식물소스로부터의 PLD 조효소 추출



(2) PLD 조효소의 정제

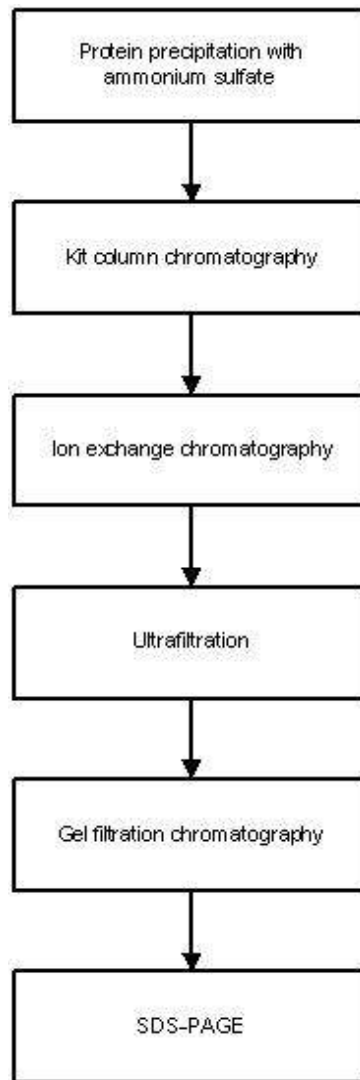


그림 20. PLD 정제 과정

(가) Ammonium sulfate를 이용한 단백질 침전

단백질이 섞인 소량의 물질들을 얻은 후, 정제를 돕기 위해 몇 가지 간단한 방법들이 사용되는데 그 중 Salting out이란 기술은 Ammonium sulfate  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ 와 같은 높은 농도의 염을 이용해 단백질을 침전시키는 방법이다. 즉, 단백질 용해도를 이용하여 salting-in(염용) 및 salting-out(침전) 방법으로 일정 염농도에서 침전되는 단백질을 원심분리로 분리하는 방법이다. 각각의 단백질은 특정한 salting out point를 가지기 때문에 이 기술로 많은 불순물을 제거할 수 있다. 따라서 Ammonium sulfate를 이용하여 다음의 방법으로 단백질을 침전시켰다.

PLD 조효소 5g에 10mM phosphate buffer(pH 6.5) 50ml을 가하여 교반한 후 4℃에서 30분 동안 방치하였다. 이를 4℃, 10,000g로 20분간 원심 분리하였다. 이 상등액에 0~20%(5.7g), 20~40%(6.15g), 40~60%(6.6g), 60~80%(7.15g)의 ammonium sulfate를 각각 가하여 4℃에서 1시간 동안 방치하였다. 이를 다시 10,000g에서 원심 분리하여 침전물을 얻었다. 이를 10mM phosphate buffer(pH 6.5)를 사용하여 투석한 후 (그림 3), 이를 UV/Vis spectrophotometer (UV-1700, Japan)를 이용하여 280nm의 파장에서 단백질 함량을 측정하였다. 또한 인지질의 가수분해활성도 측정하였다.

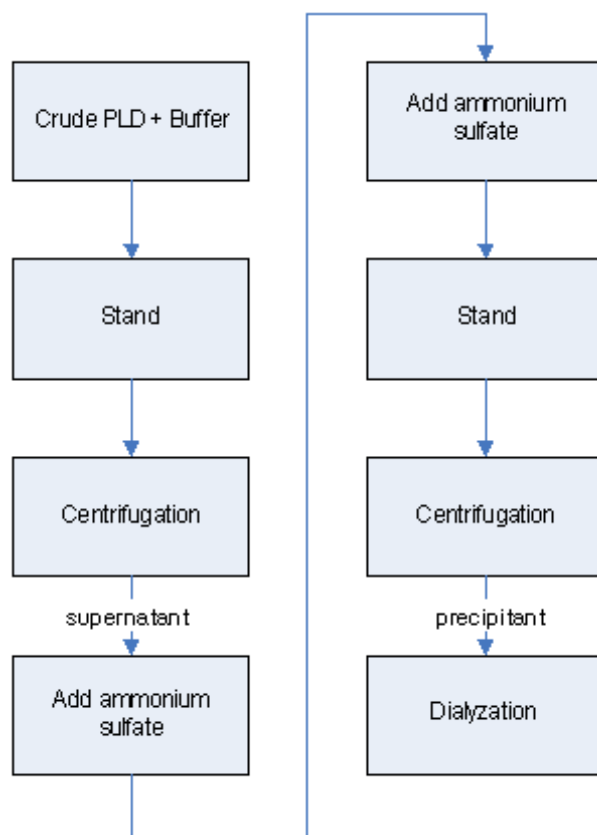


그림 21 Ammonium sulfate를 이용한 단백질 침전 과정

#### (나) 컬럼 크로마토그래피 (Kit Column Chromatography)

Ammonium sulfate를 이용하여 침전된 단백질 중 단백질 함량이 높고 효소 활성이 있는 단백질을 선택하여 kit column chromatography를 수행하였다. 사용된 column 및 buffer는 표 1과 같다. Chromatography 장치는 GE사의 AKTAPrime plus를 사용하였으며, column으로 1 mL/volume의 kit

column이 사용되었다. 시료를 A buffer로 투석한 후 A buffer로 평형화 된 kit column에 투석된 시료를 주입하였다. 그리고 B buffer에 의해 용출된 fraction의 단백질 농도 및 활성을 측정하였다.

표 1 Column chromatography 분석을 위한 buffer의 제조

Cation exchange column(CM-Sepharose, SP-Sepharose)	
A buffer:	10mM phosphate buffer (pH6.5)
B buffer:	10mM phosphate buffer with 0.5M NaCl (pH6.5)
Anion exchange column(DEAE-Sepharose, Q-Sepharose)	
A buffer:	20 mM Tris-HCl(pH 7.0)
B buffer:	20 mM Tris-HCl with 0.5M NaCl (pH 7.0)

(다) 이온교환 크로마토그래피 (Ion exchange chromatography)

단백질은 구성아미노산 중에 산성, 염기성아미노산을 함유하므로 적당한 pH 조건하에서는 양(+) 또는 음(-)의 전하를 가지고 있다. Column에 전해질의 고분자물질을 충전제로 넣고 각종 단백질의 전하량과 충전제의 이온 상호작용의 차이에 따라 단백질을 분획하는 방법이 이온교환 크로마토그래피(ion-exchange chromatography)이다. 음전하를 가져 양이온을 흡착하는 고분자담체가 양이온 교환체(cation exchanger), 양전하를 가져 음이온을 흡착하는 고분자담체를 음이온 교환체(anion exchanger)라 한다. 단백질 정제에 흔히 이용되는 양이온 교환체는 carboxymethyl cellulose(CM-cellulose)이며 cellulose의 히드록시기에 carboxymethyl기(-CH<sub>2</sub>COO-)가 부가한 구조를 가져 음전하를 띠므로 양전하를 가진 단백질 분자를 흡착한다. 이에 대하여 음이온 교환체로 diethylaminoethyl-cellulose(DEAE-cellulose)가 있다. 이것은 cellulose의 히드록시기에 diethylaminoethyl기[-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N+(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]가 부가된 구조를 가져 양전하를 띠므로 음전하를 가진 단백질을 흡착한다. 이러한 이온 교환체를 컬럼에 채우고 단백질 혼합물을 가하여 완충액의 pH 또는 이온강도를 변화시키면서 용출하면 각 단백질을 전하상태에 따라 분획할 수 있다.

40~80% 농도의 Ammonium sulfate를 사용하여 회수된 단백질로 이온교환 크로마토그래피를 실시하였다. GE사의 AKTA-Prime plus 장치와 DEAE-Sepharose CL-6B(2.6×30cm) kit column 을 사용하였다.

단백질을 20mM Tris-HCl(pH7.5) buffer로 투석한 후, 투석물을 DEAE-Sepharose에 로딩 하였다. 비흡착 단백질을 제거한 후, NaCl을 1.0 M의 농도까지 직선적으로 증가시키면서 흡착 단백질을 용출시켰으며, 1 fraction 당 4 mL씩 회수하였다.

#### (라) 한외여과(Ultrafiltration)

한외여과는 막을 이용하여 액체 중에 용해되거나 분산된 물질을 입자의 크기나 분자량 크기별로 분획하는 방법이다. 한외여과는 정밀여과막과 역삼투막 사이에 위치하며 반투막을 이용하여 용액 내의 물질의 크기에 따라 분리하는 방법으로 분자 크기가 0.005 ~0.5 $\mu$ m(300 ~500,000Dalton)정도의 범위를 처리할 수 있다. 한외여과막은 미세다공성(Finely-Porous)인 역삼투막처럼 극히 치밀한 세공을 지니고 있지 않으며, 다공성(Porous)인 정밀여과막처럼 세공을 현미경으로 용이하게 관찰할 수도 없는 대략10 ~500Å범위의 세공 크기를 갖고 있다. 이러한 이유 때문에 한외여과막은 막에 의해 90% 이상의 배제도를 나타내는 용질의 최소 분자량으로 정의되는 분획분자량(Molecular Weight Cut Off, MWCO)으로서 그 분리 성능을 나타낸다. 한외여과막은 백신, 발효생성물, 효소, 그리고 다른 단백질을 분리하기 위해 제약, 화학, 그리고 식품산업에 널리 사용된다. 또한 한외여과는 화학물질과 생물물질을 고순도로 농축하는 데 사용되는 에너지 효율적이고 경제적인 분리방법이다.

본 실험에서는 DEAE-Sepharose column에서 분리된 fraction의 단백질을 농축하기 위하여Amicon Ultra-4 Centrifugal filter(MW, 10,000. Amicon, Co., USA.)를 사용하여 10,000rpm에서 30분 동안 원심 분리하였다. 농축된 단백질은 Bradford법으로 분석되었다.

#### (마) 겔 여과 크로마토그래피 (Gel filtration chromatography)

겔 여과 크로마토그래피(gel filtration chromatography)는 투석과 마찬가지로 분자를 크기에 따라 분획할 수 있는 방법이다. 가교한 dextran gel(Sephadex), polyacrylamide gel(Bio-gel), agarose gel 등을 작은 입자상으로 가공한 것을 충전제로 이용한다. 이 고분자 gel의 입자는 다수의 매우 작은 체(篩) 구멍이 있는 작은 공과 같아서 이것을 채운 column에 여러 가지 크기의 분자량을 가진 단백질 혼합물을 가해서 용출시키면 체 구멍보다 큰 지름을 가진 단백질 분자는 확산하지 않고 그대로 칼럼에서 유출하고, 체 구멍을 통과하는 작은 단백질 분자는 충전제 중에 확산하면서 column을 통과하므로 천천히 유출한다. 그러므로 분자의 크기에 따라 단백

질을 분획할 수 있다. 이러한 겔 여과 칼럼을 분자체(molecular sieve)라 한다.

Ultrafiltration을 통해 농축한 단백질이 Gel filtration chromatography에 사용되었으며, 0.1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl(pH7.0) buffer로 투석한 후 HiLoad Superdex-200 column(16×60cm)에 주입하여 물질을 분자량별로 분리하였다.

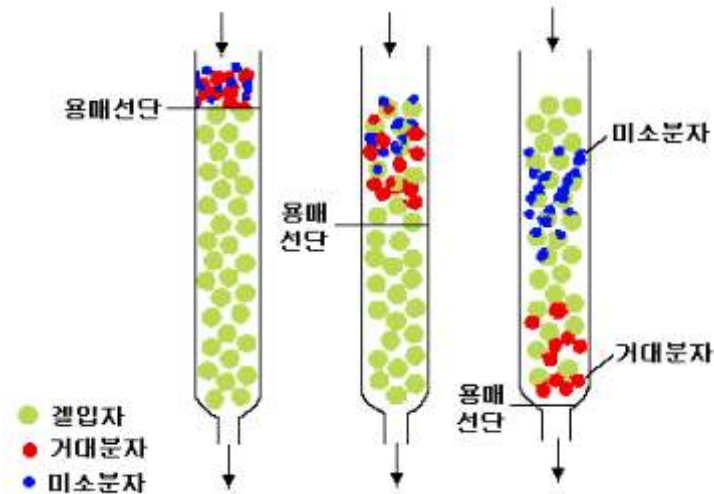


그림 22 겔 여과 크로마토그래피 과정

### (3) 배추 PLD 대량 생산 방법

배추 시료와 시료의 1.5배에 해당하는 정제수를 혼합하여 갈아준 뒤 200mesh의 체에 거르며 압착한 후, 5미크론 텡스필터로 여과한다. 이 여과액을 55℃에서 3분간 열처리한 후 급랭시켜 4℃에서 1시간 정치시킨 후 다시 5미크론 텡스필터로 여과한다. 여기에 여과액 질량의 1% 규조토를 첨가한 후 교반하면서 1미크론 텡스필터로 여과한 다음 그 여과액을 원심분리(8,000rpm, 4℃, 30min)하여 얻은 상층액을 0.2 미크론 텡스필터로 여과하여 액상의 조효소 추출액을 얻는다. 이 추출액을 포화농도 40%가 되도록 황산암모늄을 가한 후 1시간 동안 정치하여 원심분리(10,000g, 4℃, 20min)하고 상층액에 다시 포화농도 80%가 되도록 황산암모늄을 가한 후 같은 조건으로 원심분리 한다. 이 때 얻은 침전물을 완충액에 녹여 한외여과로 탈염한 후 냉동 혹은 동결건조하여 보관하도록 하였다.

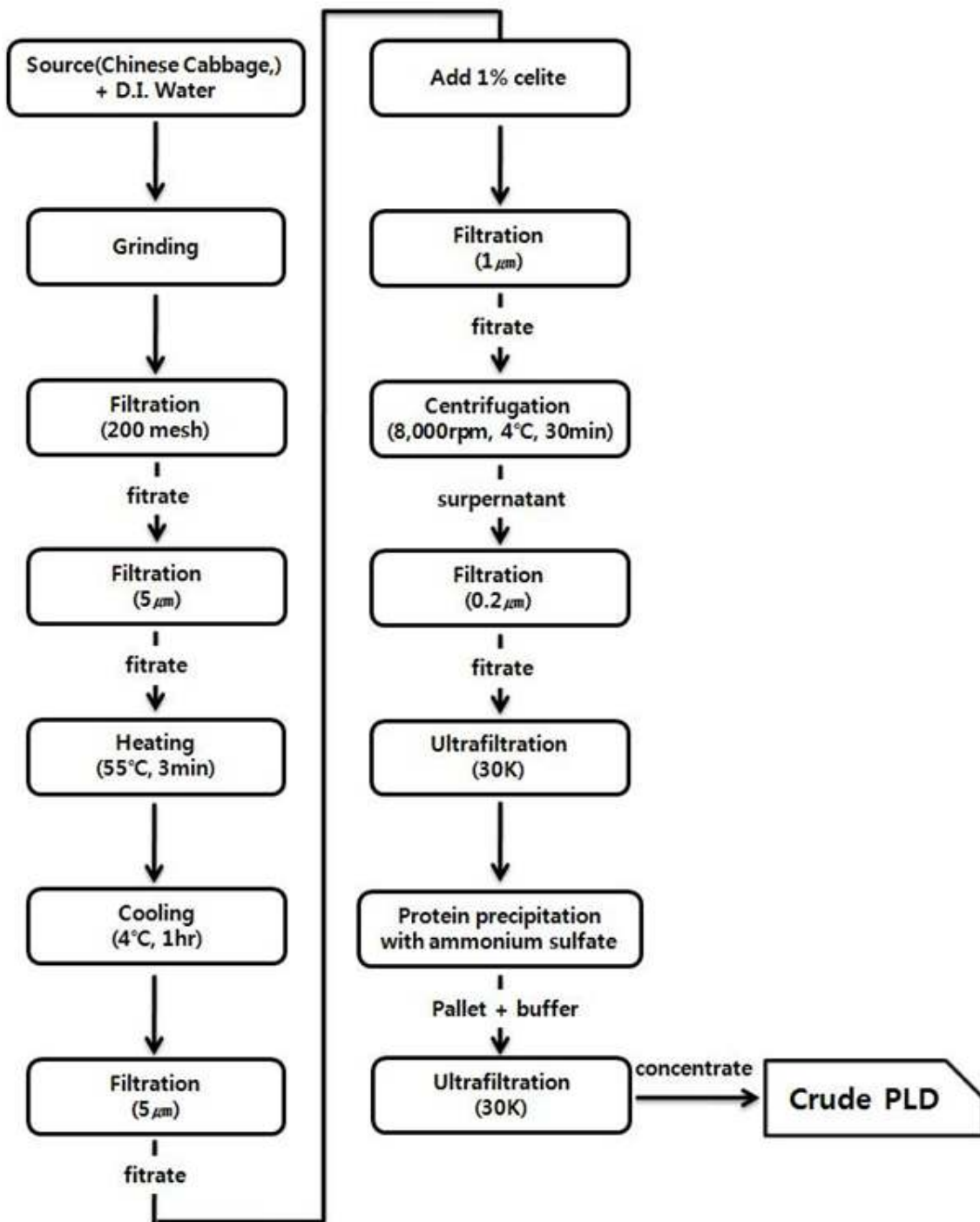


그림 23 국산 배추를 이용한 조효소 PLD 대량 추출법

## 다. 분석방법

### (1) PLD 조효소의 활성화 측정

#### (가) 적정법(Titration)

인지질 2.5mg을 1ml의 diethyl ether에 용해시킨 것을 기질용액으로 하여 40mM CaCl<sub>2</sub>를 포함하는 2mM sodium acetate buffer(pH 5.7)와 효소용액을 혼합하였다. buffer/기질용액/효소용액(270/20/1, v/v/v) 을 30℃ shaking incubator에서 150rpm으로 1시간동안 반응하였다. 반응 후 0.005N 알코올성 KOH용액으로 적정함으로써 가수 분해된 인지질의 양을 측정하였다. 반응량은 다음의 식을 이용하여 산출하였고, 효소 활성화도 1unit는 pH 5.6, 30℃에서 1분 동안 PC로부터 1μM의 PA를 생성하는데 필요한 효소의 양으로 정의하였다.

$$n[\text{P.A.}] = \text{A.V.} \times m[\text{Total Volume}] / M[\text{KOH}]$$

n[P.A.] : gram mol of Phosphatidic acid

A.V : Acid Value in mg/g

m[Total Volume] : mass of Total Volume

M[KOH] : molar mass of KOH in mg

$$\rightarrow n[\text{P.A.}] = \frac{\{0.28(\text{mg/ml}) \times \text{적정량}(\text{ml}) \times \text{반응총부피}(\text{ml})\}}{\{56(\text{mg/mg-mol}) \times \text{적정시료량}(\text{ml})\}} = 5 * 10^{-3} * \text{적정량}(\text{ml})$$

#### (나) HPLC/ELSD 분석법

기질인 PC의 농도가 5mg/ml이 되도록 50mM CaCl<sub>2</sub>를 포함한 50mM Sodium acetate buffer(pH 5.6)에 녹인 다음 15분 동안 Sonication 하였다. 이 용액 2ml에 효소와 silica gel 0.8g을 첨가하여 30℃에서 1시간동안 600rpm으로 교반한 후, Chloroform: methanol (1:1, v/v) 16ml과 증류수 4ml을 가하고 잘 혼합하여 5000rpm으로 5분간 원심 분리한다. 이를 분별 깔때기로 옮겨 30분 동안 방치한 다음 Chloroform층을 취하여 용매를 기화시킨다. 농축된 인지질은 chloroform으로 다시 녹여 HPLC로 분석함으로써 생성된 PA의 정량이 가능했다. 효소 활성화도 1unit는 pH 5.6, 30℃에서 1분 동안 PC로부터 1μM의 PA를 생성하는데 필요한 효소의 양으로 정의하였다.

### (2) 인지질 분석방법

#### (가) HPLC/ELSD에 의한 분석

기질로 사용되는 인지질의 조성 및 PLD 효소와의 반응 후 변화된 인지질의 조성을 분석하기 위해 ELSD 검출기가 장착된 액체크로마토그래프를 사용하였다. 분석용 column으로는 Alltima HP silica column (10cm length, 4.6mm ID, 3µm particle size)을 사용하였다. 시료의 분리를 위한 용매와 분석조건 및 인지질 표준물질 크로마토그램은 표 2와 그림 1에 나타내었다.

#### (나) TLC에 의한 분석

분석하고자 하는 인지질을 클로로포름에 4mg/ml이 되도록 용해시킨 뒤 샘플을 실리카겔 TLC 판에 올린 후 Chloroform: Methanol: Ammonium hydroxide (65: 25: 4, v/v/v)를 전개용매로 하여 10cm 전개시킨다. TLC 판을 건조시킨 뒤 요오드 증기를 이용하여 발색시킨 다음 표준시약과 비교하여 동정한다.

#### (3) 단백질 분석방법

##### (가) Bradford법

PLD 조효소 용액 100ul를 시험관에 로딩한 후 Bradford 시약 1ml을 가하여 vortex mixer로 잘 교반한다. 20분 동안 상온에서 방치한 후 UV/VIS spectrophotometer(T60-UV, Human Co.)를 이용하여 595nm에서 흡광도를 측정한다. Bovine serum albumin(BSA)을 표준물질로 사용하였으며, 작성한 검량선으로부터 단백질의 농도를 산출하였다.

##### (나) BCA 법

PLD 조효소 용액 50ul를 시험관에 로딩한 후 BCA 시약 1ml을 가하여 소용돌이 혼합기 (vortex mixer) 로 잘 교반한다. 30분 동안 상온에서 방치한 후 자외선-가시광선 흡광도계 (T60-UV, Human Co.)를 이용하여 562nm에서 흡광도를 측정한다. 소혈청알부민(BSA)을 표준물질로 작성한 검량선으로부터 단백질의 농도를 산출하였다.

##### (다) 전기영동법 (SDS-PAGE)

PLD 분자량 및 정제된 PLD의 순도 등을 확인하기 위해 PLD 용액을 Sample buffer(Tracking dye)와 1:1(v/v)의 비로 혼합하여 100℃의 항온조에서 3분간 가열한 다음 냉각하여 Acrylamide gel(12% Separating gel, 5% Stacking gel)에 로딩 하였다. 단백질의 이동이 진행된 후 EzWay Protein-Blue I solution을 이용하여 겔을 염색하고, 증류수로 탈색하였다.



Molecular Imaging software(Eastman Kodak company)를 이용하여 PLD의 분자량을 분석하였다. Bio-rad 사의 전기영동 시스템이 분석에 사용되었다.

### 3. 연구결과

#### (1) PLD 조효소의 추출

54.6kg의 국산배추로부터 31.28g(yield 0.057%)의 PLD 조효소 분말을 얻었으며, PLD 조효소 용액의 단백질 함량은 0.5mg/ml 이었다. 또한 인지질의 가수분해활성을 측정함으로써 조효소 용액이 약 2.6U/ml의 활성도를 가짐을 알 수 있었다.

#### (2) PLD의 분리 및 정제

##### (가) Ammonium sulfate를 이용한 단백질 침전

Ammonium sulfate를 이용하여 포화농도를 0~20%, 20~40%, 40~60%, 60~80%의 4개의 그룹으로 나누어 시도한 결과 Total protein은 40~60%, 60~80%에서 각각 24.57mg, 12.41mg으로 높아 이 두 농도의 ammonium sulfate를 사용하여 침전시킨 단백질을 column chromatography에 사용하였다(표 3). 두 농도에서 침전된 단백질의 인지질 가수분해 활성은 표 4와 같다.

표 3 Ammonium sulfate 처리 후 단백질 함량

Sample	OD 750nm	Protein (mg/mL)	Ave	STD	Total protein(mg)
0~20% (16ml)	0.115	0.216	0.21	0.01	3.34
	0.110	0.201			
20~40% (6ml)	0.258	0.652	0.67	0.02	4.00
	0.267	0.680			
40~60% (5ml)	0.848	4.902	4.91	0.02	24.57
	0.852	4.927			
60~80% (5ml)	0.866	2.506	2.48	0.03	12.41
	0.850	2.457			

표 4 Ammonium sulfate 처리 후 효소활성 측정

Sample	Titration volume(mL)	Ave	Protein (mg)	Reaction time(min)	<sup>1)</sup> n[P.A.]	<sup>2)</sup> n[P.A.]“
Blank	1.68					
40~60%	3.02	1.24	4.91	60	0.0062	2.105*10 <sup>-5</sup>
	2.82					
60~80%	2.56	0.98	2.48	60	0.0049	3.293*10 <sup>-5</sup>
	2.76					

(나) Kit Column chromatography

Ammonium sulfate를 이용하여 침전된 단백질 중 단백질 함량과 효소활성이 높은 40~60%, 60~80%의 침전물을 획득하여 kit column chromatography를 실시하였다. Active fraction의 단백질 함량과 효소활성을 측정한 결과 DEAE-Sepharose column 및 Q-Sepharose column에서 효소가 흡착되어 B buffer에 의해 용출되었고, 효소활성 및 분리도가 높은 것으로 확인되었다. (표 5) 또한 DEAE-Sepharose column을 사용한 경우 40~60%, 60~80%의 Ammonium sulfate로 회수된 단백질 모두 인지질 가수분해활성이 있었고, Q-Sepharose column을 사용한 경우 40~60%의 포화구간에서 회수된 단백질만 활성이 있었다. (표 6)

1) n[P.A.] : 생성된 Phosphatidic acid의 mg-mol 함량.

2) n[P.A.]“ : 분당 효소가 생성한 Phosphatidic acid의 mg-mol 함량.

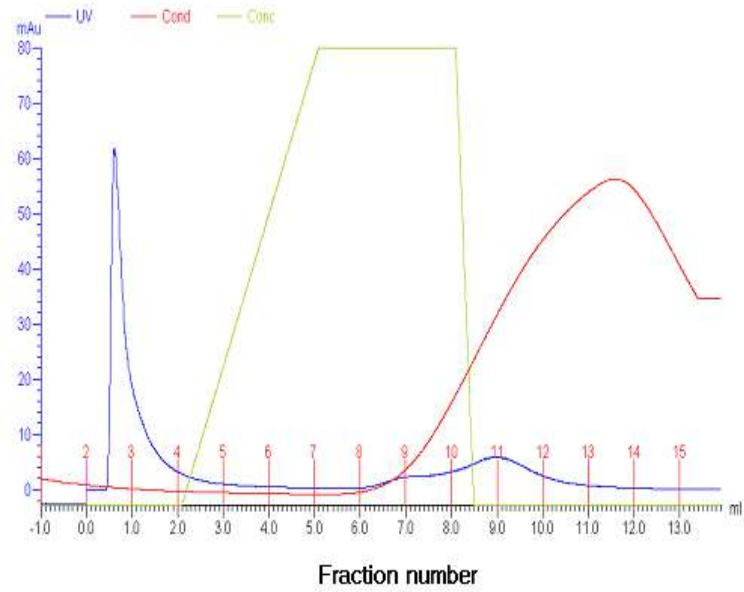


그림 24. CM-Sepharose Kit Column(1ml/vol)의 40 ~ 60% 범위에서의 포화 ammonium sulfate 용액의 salting-out 후 크로마토그램

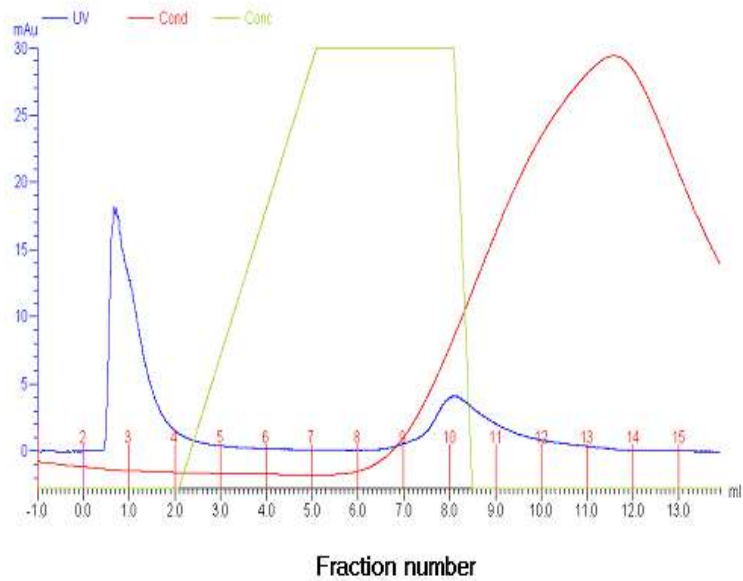


그림 25. CM-Sepharose Kit Column(1ml/vol)의 60 ~ 80% 범위에서의 포화 ammonium sulfate 용액의 salting-out 후 크로마토그램

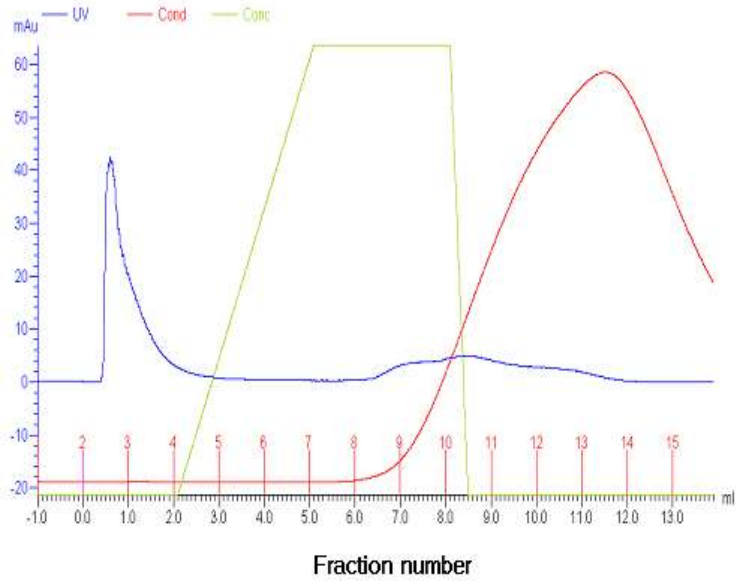


그림 26. SP-Sepharose Kit Column(1ml/vol)의 40~60% 범위에서의 포화 ammonium sulfate 용액의 salting-out 후 크로마토그램

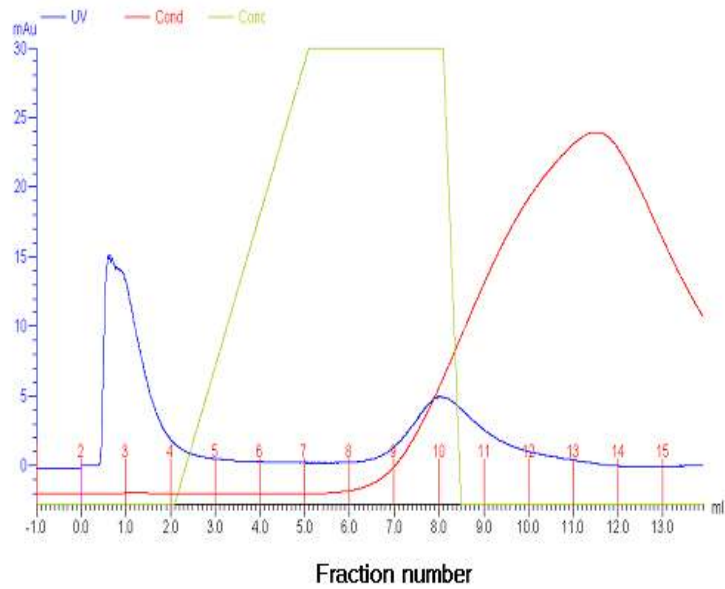


그림 27. SP-Sepharose Kit Column(1ml/vol)의 60~80% 범위에서의 포화 ammonium sulfate 용액의 salting-out 후 크로마토그램

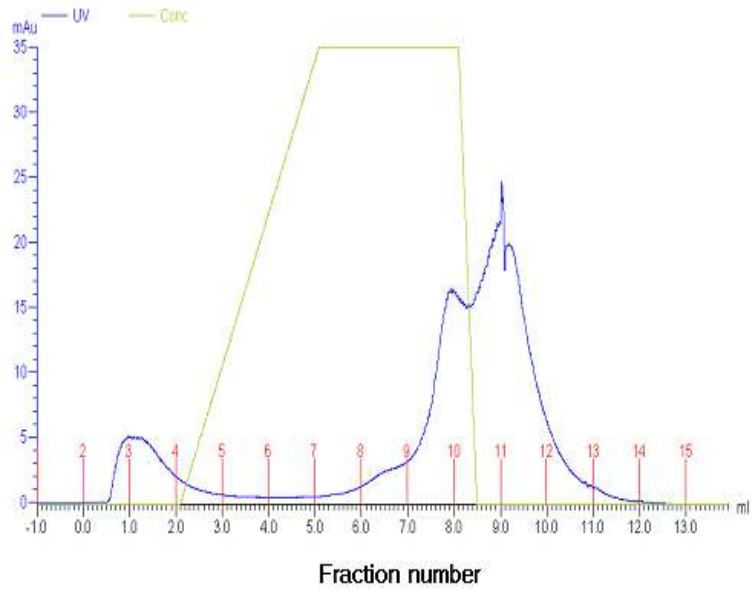


그림 28. DEAE-Sepharose Kit Column(1ml/vol)의 40 ~ 60% 범위에서의 포화 ammonium sulfate 용액의 salting-out 후 크로마토그램

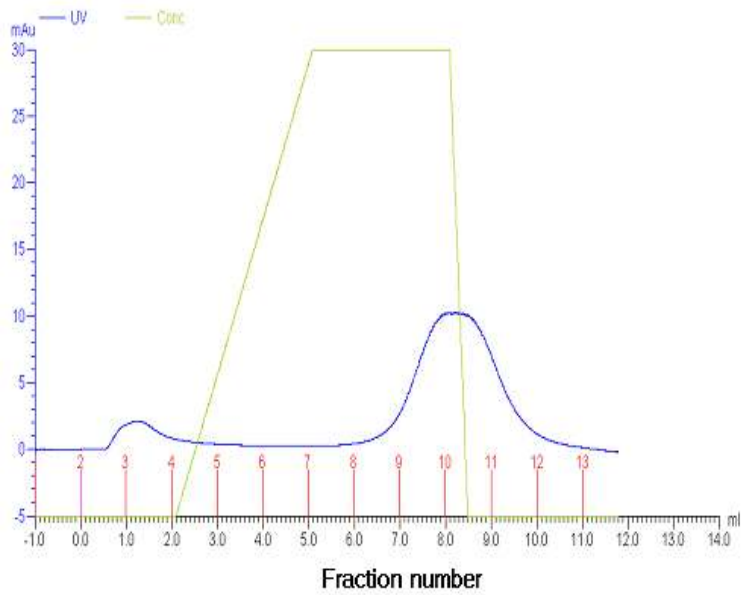


그림 29. DEAE-Sepharose Kit Column(1ml/vol)의 60 ~ 80% 범위에서의 포화 ammonium sulfate 용액의 salting-out 후 크로마토그램

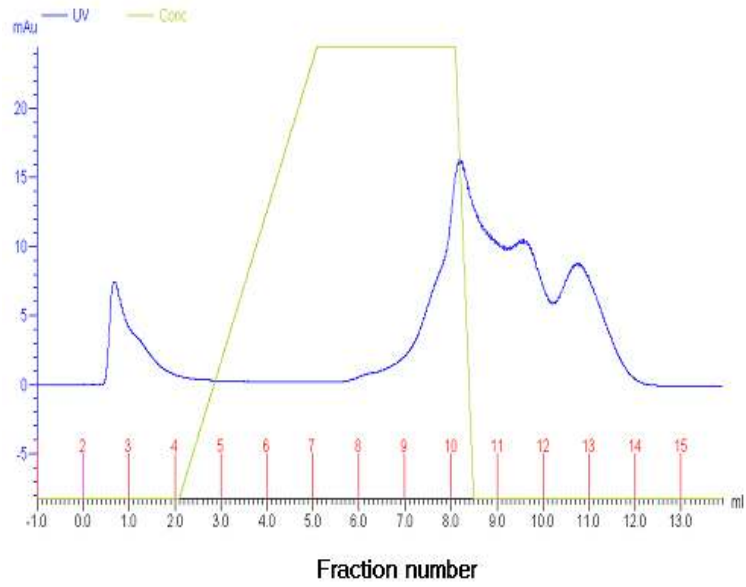


그림 30. Q-Sepharose Kit Column(1ml/vol)의 40~60% 범위에서의 포화 ammonium sulfate 용액의 salting-out 후 크로마토그램

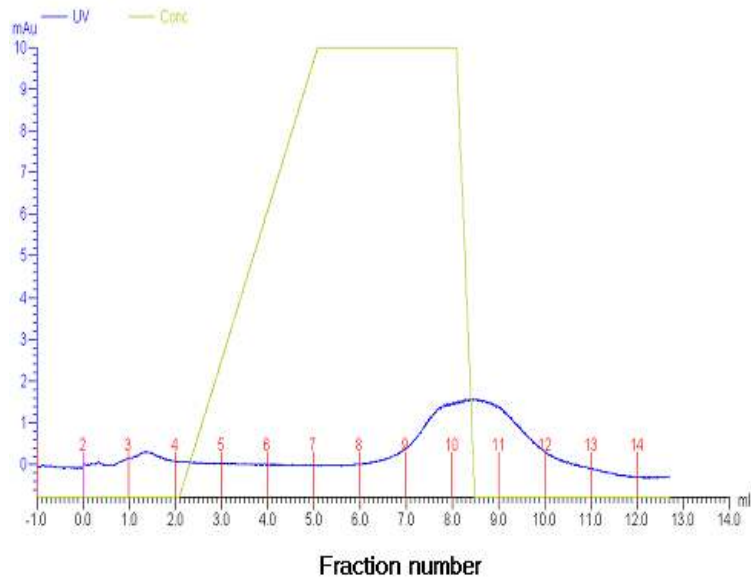


그림 31. Q-Sepharose Kit Column(1ml/vol)의 60~80% 범위에서의 포화 ammonium sulfate 용액의 salting-out 후 크로마토그램

표 5 Kit column chromatography의 active fraction 단백질 함량

Column	Ammonium sulfate(%)	Fraction number	OD 750nm	Protein (mg/ml)	Ave	Total protein(mg)
CM- Sepharse	40~60	10	0.021	-0.07	-0.07	-0.07
			0.021	-0.07		
	60~80	10	0.030	-0.04	-0.05	-0.05
			0.026	-0.05		
SP- Sepharse	60~80	10	0.025	-0.06	-0.06	-0.06
			0.023	-0.06		
DEAE- Sepharse	40~60	11	0.083	0.12	0.12	0.12
			0.083	0.12		
	60~80	10	0.066	0.07	0.06	0.06
			0.062	0.05		
Q- Sepharse	40~60	10	0.063	0.06	0.05	0.05
			0.060	0.05		
	60~80	10	0.031	-0.04	-0.04	-0.04
			0.033	-0.03		

표 6 Kit column chromatography의 active fraction 효소활성

Column	Ammonium sulfate(%)	Fraction number	Titration (ml)	Ave	Protein (mg)	n[P.A.]	n[P.A.]“
Blank			2.08				
CM- Sepharse	40~60	10	2.40	0.26	-0.07	0.0013	$-3.095 \times 10^{-4}$
			2.28				
CM- Sepharse	60~80	10	2.30	0.22	-0.05	0.0011	$-3.667 \times 10^{-4}$
			2.30				
SP- Sepharse	60~80	10	2.34	0.23	-0.06	0.0012	$-3.194 \times 10^{-4}$
			2.28				
DEAE- Sepharse	40~60	11	2.28	0.29	0.12	0.0015	$2.014 \times 10^{-4}$
			2.46				
DEAE- Sepharse	60~80	10	2.40	0.37	0.06	0.0019	$5.139 \times 10^{-4}$
			2.50				
Q- Sepharse	40~60	10	2.54	0.34	0.05	0.0017	$5.667 \times 10^{-4}$
			2.30				
Q- Sepharse	60~80	10	2.58	0.46	-0.04	0.0023	$-9.479 \times 10^{-4}$
			2.49				

(다) Ion exchange chromatography

DEAE-Sepharose column에 loading 하여 비흡착 단백질을 제거한 후, NaCl을 1.0 M의 농도까지 직선적으로 증가시키면서 흡착 단백질을 용출한 결과 39~75번 fraction까지 4개의 Peak가 나타났다 (그림 14). 각 fraction의 효소활성을 측정한 결과 41~46, 69~75까지의 fraction에서 활성이 가장 높게 나타났다.(그림 15) 따라서 41~46, 69~75 fraction을 모아서 단백질 농도 및 효소활성을 측정하였다. (표 7, 8)

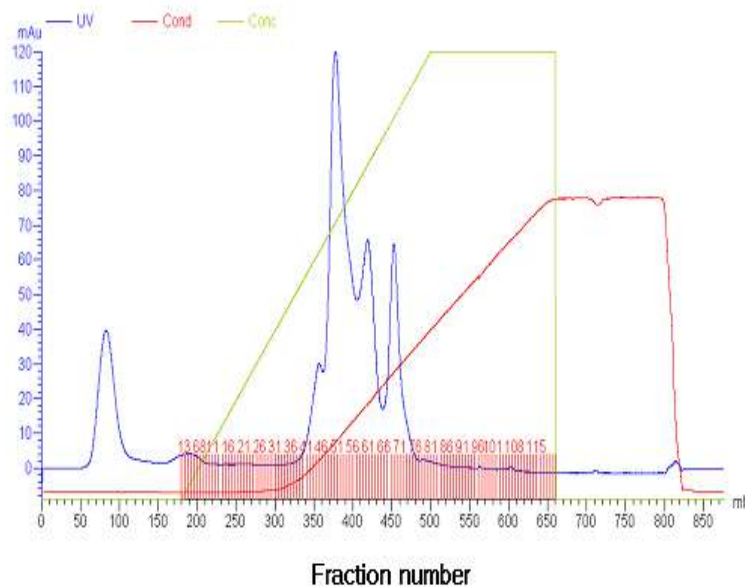


그림 32. DEAE-Sepharose CL-6B(2.6×30cm)의 40~80% 범위에서의 포화 ammonium sulfate 용액의 salting-out 후 크로마토그램 (Sample 19ml)



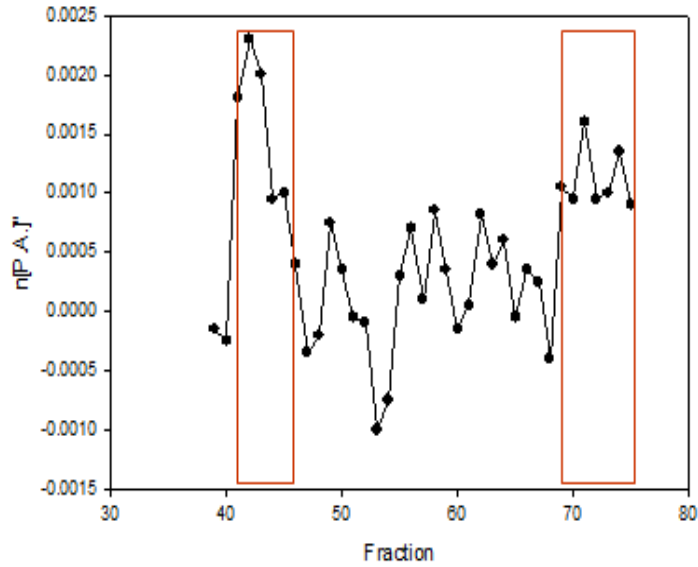


그림 33. DEAE- Sepharose CL-6B(2.6×30cm) 크로마토그 래피 후 효소 활성 측정 (39 ~ 75 fraction)

표 7 DEAE-Sepharose Active fraction의 단백질 함량 (41~46, 69~75)

Fraction number	volume	OD750nm	Protein (mg/mL)	Ave	STD	Total protein(mg)
41-46	22mL	0.099	0.17	0.17	0.01	3.82
		0.103	0.18			
69-75	25.5mL	0.040	-0.01	-0.03	0.02	-0.66
		0.031	-0.04			

표 8 DEAE-Sepharose Active fraction의 효소활성(41~46, 69~75 fraction)

Fraction number	volume	0.05N KOH	Ave	단백질 함량(mg)	n[P.A.]	n[P.A.]“
Blank		2.24				
41-46	22mL	2.40	0.16	0.17	0.0008	7.843*10 <sup>-5</sup>
		2.40				
69-75	25.5mL	2.36	0.09	-0.03	0.00045	-2.5*10 <sup>-4</sup>
		2.30				

(라) Ultrafiltration

표 9 Ultrafiltration 후 단백질 함량

Sample	volume (mL)	OD750nm	Protein (mg/mL)	Ave	STD	Total protein(mg)
10000이하 (22.9mL)	22.9	0.065	0.06	0.06	0.00	1.40
		0.063	0.06			
10000이상 (2mL)	2	0.065	0.06	0.06	0.00	0.13
		0.065	0.06			

표 10 Ultrafiltration 후 효소활성 측정

Sample	volume (mL)	0.05N KOH	변화량 (mL)	Ave	단백질 함량(mg)	n[P.A.]	n[P.A.]“
Blank		2.22					
10000 이하	22.9	2.44	0.22	0.0	0.06	0.0002	5.556*10 <sup>-5</sup>
		2.08	-0.14	4			
10000 이상	2	2.66	0.44	0.3	0.06	0.0017	4.722*10 <sup>-4</sup>
		2.46	0.24	4			

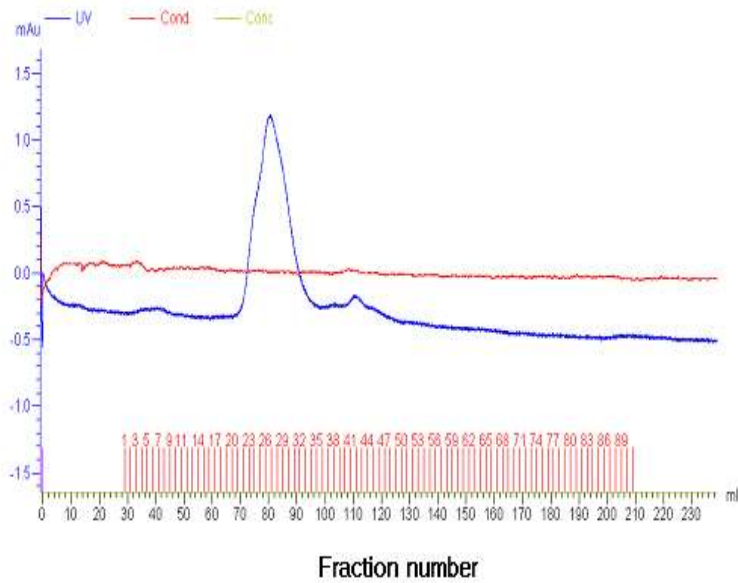


그림 34. DEAE-sepharose (sample 2ml)의 활성 부분의 HiLoad Superdex-200 겔 여과 크로마토그램 (16×60cm)

표 11 Ultrafiltration 후 단백질 함량

Fraction	volume	OD 750nm	Protein (mg/mL)	Ave	STD	Total protein(mg)
24-31 (After UF)	2.25	0.051 0.051	0.02 0.02	0.02	0.00	0.34

표 12 HiLoad Superdex-200 Active fraction 효소활성 측정

Sample	volume	0.05N KOH	Ave	Protein (mg)	n[P.A.]	n[P.A.] “
Blank		2.43				
24-31 (After UF)	2.25	3.56 3.56	1.13	0.34	0.00565	2.77*10 -4

(마) Gel filtration chromatography

국산배추로부터 추출한 PLD 조효소를 Ammonium sulfate(40~80%)를 이용하여 단백질을 침전시키고, 회수된 단백질들은 DEAE-Sepharose chromatography, Ultrafiltration, Gel chromatography법을 사용하여 정제하였다. 최종적으로 정제된 효소의 specific activity는 558.8 unit/mg, 수율은 15.2%, 정제도는 95.3 배로 측정되었다. (표 13)

표 13 Purification step of phospholipase D from Chinese cabbage

Purification Step	Total activity(U)	Total protein(mg)	<sup>3)</sup> Specific activity(U/mg)	<sup>4)</sup> Yield ( % )	<sup>5)</sup> Purification (fold)
Supernatant	1,250	213.36	5.86	100	1
Ammonium sulfate (40~80%)	337.5	48.75	6.92	27	1.18
DEAE -Sepharose	275	3.82	72	22	12.29
Superdex-200 &Ultrafiltration	190	0.34	558.8	15.2	95.3

3) Specific activity = total activity / total protein

4) Yield = (total activity)/(total activity of supernatant) \* 100

### (바)SDS-PAGE

PLD 조효소와 이를 정제한 효소를 SDS-PAGE로 분석하여 정제된 효소의 순도 및 분자량을 확인하였다. 여러 크기의 단백질을 포함하는 PLD 조효소를 정제함으로써 약 90kD, 66kD인 두 크기의 단백질만을 얻었지만 bend를 확인하였지만 66kD인 단백질의 경우 그 농도가 매우 낮아 90kD의 bend가 PLD 일 것으로 사료되며, 추후 66kD의 분자량을 가지는 단백질을 이용한 인지질의 가수분해 활성을 통해 좀 더 명확하게 PLD를 동정해야 한다. 본 연구에서 추출 및 정제한 국산배추의 PLD의 분자량은 약 91kD으로 알려져 있는 양배추 유래의 PLD와 비슷함을 확인하였다 (그림 17).

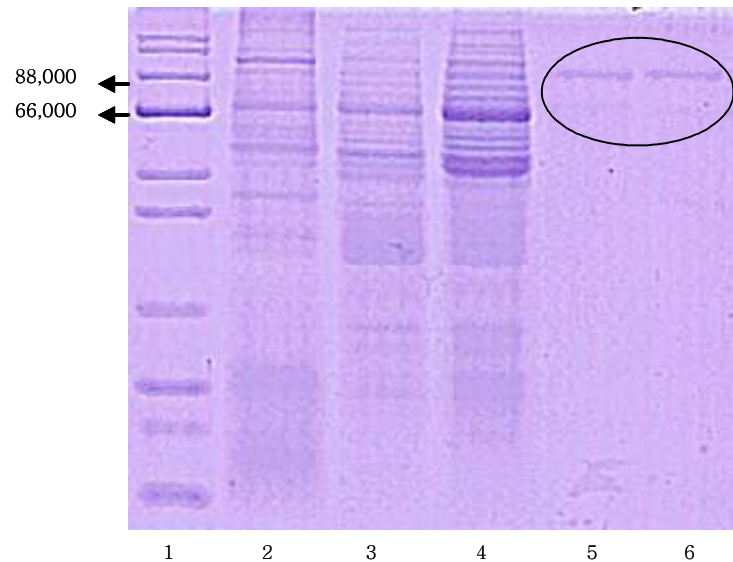


그림 35. SDS-PAGE를 이용한 PLD 정제단계의 특성 분석  
1; EzWay™ Protein-Blue MW Marker, 2; Phospholipase D, Type IV:From Cabbage (From Sigma), 3; Crude PLD from Chinese cabbage, 4; Ammonium sulfate Precipitation (40~80%), 5; Active fraction of DEAE-Sepharose chromatography, 6; Active fraction of Gel Chromatography

### (3) 대량 추출한 국산 배추 유래의 PLD 조효소 추출

5) Purification(fold) = (Specific activity)/(Specific activity of supernatant)

약 19.2kg의 국산배추로부터 약 1L의 추출액을 얻었으며, 황산암모늄 침전법으로 정제한 PLD 조효소 용액은 1,000U/ml 이상의 용액으로 150ml이었다. 이 조효소 용액의 단백질 함량은 29.58mg/ml 이었으며, 비활성(specific activity)은 30~40unit/mg 이었다. 기존의 아세톤 침전법은 정제된 단백질의 총량이 황산암모늄에 비해 1.5배 정도 많았으나, 정제 결과 총활성(total activity)이 황산암모늄 침전법과 유사하였다. 따라서 효소의 순도가 황산암모늄 침전법이 약 1.5배 높은 것을 확인할 수 있었으며, 유기용매를 사용하지 않아도 된다는 장점도 있다.

#### 4. 결론

국산배추로부터 추출한 PLD 조효소를 크로마토그래피를 사용하여 정제하였다. 여러 종류의 kit column chromatography를 수행함으로써 Anion exchange column 중 DEAE-Sepharose column이 회수된 단백질 함량 및 인지질의 가수분해활성 면에서 가장 적합함을 알 수 있었다. 또한 이를 Ion exchange chromatography를 통해 한 번 더 정제하고, ultrafiltration을 이용하여 단백질을 농축한 후, gel filtration chromatography로 마지막 정제를 수행하였다. 이를 통해 최종적으로 정제된 효소의 specific activity는 558.8 unit/mg, 수율은 15.2%, 정제도는 95.3 배임을 확인하였고, SDS-PAGE 분석을 통해 분자량은 cabbage 유래 PLD와 비슷한 약 90kD임을 확인하였다.

크로마토그래피를 이용한 PLD의 분리 및 정제는 성공적이었으나, 정제 과정이 복잡하여 이를 Pilot 프로세스에 적용하기는 힘들며, 또한 경제적인 측면을 고려할 때 크로마토그래피에 비해 정제 효율은 다소 낮더라도 쉽고 간단한 방법의 모색이 필요하여 대량생산이 가능한 PLD 추출법을 개발하여 황산암모늄을 이용한 염침전 외 별도의 정제 과정을 거치지 않은 조효소 PLD를 얻을 수 있었으며, 배추 kg당 7,500unit 이상의 효소의 생산이 가능하게 되었다.

## 제 3 절 효소 고정화 (PLA2, PLD)

### 1. 연구 배경

생축매로써의 효소(Enzyme)는 여러 가지 형태의 지지체(carrier)에 고정화함으로써 효소의 재사용에 따른 효소 life-span 연장으로 생산성 향상과 단위비용 감소라는 경제적 이익을 얻을 수 있으며, 생축매의 관리 및 사용 환경이 용이해진다. 즉, 사용의 편리성과 함께 비용의 절감효과가 있다. 또한 최종 제품에 효소가 잔존하지 않아 제품의 오염을 원천적으로 차단할 수 있다. 더불어 고정화된 효소는 일반적으로 Free enzyme 형태에 비하여 증대된 안정성으로 인해 보존기간이 길어지고, 보관 기간 중 효소의 활성도가 보다 높게 유지되며, pH 또는 반응온도 등의 반응조건의 범위가 증가하여 반응 공정에서 야기될 수 있는 반응 조건의 변이 등에 저항력이 생긴다.

특히 산업적으로 가장 효율이 높다고 판단되는 packed-bed system의 경우 Stirred tank reactor와 달리 반응 도중 pH 나 온도조건이 조금씩 변화될 때 이를 사전에 차단할 수 없으므로 효소의 안정성을 확보하는 노력이 무엇보다 중요하다. 최근에는 고정화 과정에서 문제되는 효소의 불활성화를 최대한으로 줄이고, 활성도와 안정성을 향상시키는 다양한 기술들이 소개되어 있다.

결국, 고정화 하고자 하는 효소의 특성과 공정 특성을 동시에 고려하여 최대 활성도와 안정성을 달성하는 ideal biocatalyst 제작을 위한 immobilization method 가 개발되어야 한다.

### 가. 일반적 고정화의 종류 및 특성

#### (1) 흡착법(Absorption method)

흡착법은 가장 손쉬운 고정화 방법으로 다공성의 지지체(Macroporous carrier)의 pore에 효소가 포집되도록 하여 고정화 하는 방법으로 대표적인 물리적 고정화 방법이다. 흡착법에는 일반적으로 실리카, 규조토(celite) 등 약 100nm ~ 2,000nm 의 pore 가 존재하는 inorganic carrier가 흔히 사용된다. 더불어 합성 폴리머 비드, 또는 Mesoporous molecular sieve 등도 흡착법에 이용되는 추세다.

그러나, 흡착법은 고정화된 효소와 지지체와의 결합력이 매우 약하다. 따라서 계속된 반응 공정 중에 효소가 반응용액으로 점차 유리되어 효소의 탈리 현상(leaching)으로 고정화 효소의 활성도가 감소하여 재사용율이 크게 떨어지는 단점이 있다.

## (2) 결합법(Binding methods)

### (가) 이온결합법(ionic binding)

이온 결합법은 비교적 약한 화학결합법으로 이온교환레진과 효소를 반응시켜서 염기성, 혹은 산성 아미노산의 잔기와 수지(resin) 표면의 기능기가 이온 결합 방식으로 결합되는 효소 고정화 방법이다.

이온교환수지는 가장 흔하게 사용되는 이온결합 지지체로 특히 음이온교환수지인 DEAE (Diethylaminoethyl) cellulose 가 대표적이다.

이온결합법은 공유결합법과 흡착법의 장단점을 보완한 예에 속한다. 즉, 지지체의 특별한 화학적 전처리가 필요 없기 때문에 고정화 반응이 매우 쉽고 경제적이며, 단순 결합법에 비해서 결합력이 높은 편이다. 따라서 상업적 공정에 대한 적용성 또한 매우 높은 편이다. 최근에는 이온 결합력을 높일 수 있는 합성수지들이 개발되어 적용되는 추세를 보이고 있다.

### (나) 공유결합법(covalent binding)

효소 고정화 방법 중 가장 강한 결합력을 지니고 있으며 일반적으로 많이 이용되는 결합법이다. 효소와 지지체 간에 강한 공유결합으로 묶여져 있어 재사용성이 매우 높으며, 물리적 충격에도 강하다. 효소와 지지체 간의 결합은 영구적으로 유지될 수 있다. 따라서 공유결합법은 오랜 시간 동안 고정화 효소를 사용할 수 있기 때문에 고가의 효소를 순도 높게 정제하는 경우 자주 사용되며, 대규모 상업적 공정에 가장 널리 쓰이는 고정화 방법으로 알려져 있다.

그러나 공유결합법의 경우 단백질의 아미노 그룹( $\text{NH}_3^+$ ) 또는 카르복실기 그룹( $\text{COO}^-$ )이 화학적으로 지지체와 결합하면서 단백질 구조의 변화로 인한 denaturing이 발생하거나, 활성부위의 아미노산이 결합에 참여하면서 활성을 잃는 등 화학적 변성이 야기된다. 이러한 효소의 화학적 변성은 기질 특이성의 변화, 활성도의 저하 등을 초래하는 단점이 있다.

### (다) 포괄법(Entrapment)

#### **Cross-linking**

Cross-linking 은 polymerization monomer를 이용하여 효소와 효소 사이를 직접적으로 가교화하는 방법이다. 가장 흔히 쓰이는 Glutaraldehyde는 인체에 대한 독성도 작고 반응조건이 간단하며, 효과가 우수하여 일반적으로 가장 많이 사용된다.

최근에는 Crosslinked Enzyme Crystals(CLEC), 또는 Crosslinked Enzyme Aggregates(CLEA) 등 cross-linking 기술을 이용한 고정화 기법이 산업적 응용 부분에서 주목을 끌고 있다. 특히 CLEC 기술은 고정화된



효소의 활성도가 매우 높고, 반응에 참여한 대부분의 단백질이 고정화 될 수 있는 특징이 있어 고정화 수율이 90%이상 까지도 다다른 장점을 가지고 있다.

### **encapsulation**

Sodium Alginate 용액과 같은 hydrophilic polymer colloid 가 CaCl<sub>2</sub> 용액과 접촉할 때 poly anion 에 해당하는 Alginate와 Ca<sup>+</sup> 이 colloidal droplet 의 surface에서 접촉하면서 불용성 polymer film 이 형성되면서 gel bead가 만들어진다. coacervation 은 microencapsulation 의 한 방법으로 전형적인 entrapment 의 한 예로, 효소 고정화를 위한 방법 중에서 매우 경제적이고 손쉽게 구현할 수 있는 장점이 있다.

soluble enzyme 은 불용성 gel bead의 내부, 또는 표면에 갇히게 되며 gel bead의 표면은 일종의 membrane 역할을 하면서 macro molecule에 해당하는 효소를 entrapping 한다. 반면 micro molecule에 해당하는 기질, 즉 phospholipids, 또는 lipids 는 membrane pore을 통해 출입하면서 반응 중에는 enzyme-substrate 복합체를 형성하고, 반응 후 생성된 product 은 pore를 통해 방출된다. 이 방법은 일반적인 흡착법에 비하여 상당히 강하게 효소를 고정화하는 효과가 있으나, covalent binding 과 같은 방법에 비해 효소의 이탈 가능성은 상당히 높다 하겠다. 따라서 gel bead의 물리적 지지체를 강화하기 위해 제 3의 폴리머(실리카, 키토산 등)로 처리하여 co-polymer를 형성하는 방법들이 주로 사용되고 있다.

이러한 coacervation 방법은 silica sol-gel process를 이용한 실리카 겔의 효소 포집과는 좀 더 다른 특성을 보여준다. silica gel 의 경우 반응 과정에서 매우 강한 시약을 사용하기 때문에 효소의 활성을 일부 또는 모두 상실할 수 있고, 생성된 실리카 겔은 수용액 내에서 aggregate된 조직이 쉽게 물리적으로 붕괴될 수 있는 단점이 있다. 따라서 실리카와 같은 inorganic carrier를 사용하는 경우에는 흡착법, 또는 covalent bonding 기법을 주로 사용한다.

## 2. 연구 방법

### 가. 실험재료 및 방법

#### (1) 실험재료

고정화에 사용할 효소는 국산배추(chinese cabbage, 학명: *Brassica campestris* ssp *pekinensis*<sup>6)</sup>)로부터 정제한 Phospholipase D를 사용하였다. Standard activity 비교를 위한 상업용 효소로는 양배추 유래의 PLD(Sigma Aldrich, USA)를 이용하였다. 그 밖에 Sodium Alginate(98%, Junsei chemical, Japan), CaCl<sub>2</sub> (98%, Sigma Aldrich, USA), TMOS (Tetramethylorthosilicate, 99%, Across), Glutaraldehyde (Grade II, Sigma Aldrich), 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES, Sigma Aldrich), Sodium Borohydride (99%, Sigma Aldrich) 등의 Reagent 들이 사용되었으며, Acetone, N-hexane 등 사용된 용매들은 EP grade 급을 사용하였다. 정제수로는 De-ionization 이 된 Distilled water를 사용하였다.

효소의 반응실험 및 활성도 검사를 위한 기질로 사용된 인지질(phospholipids)은 (주)고센바이오텍의 GL-90E(phospholipids min. 90%)로, 인지질 분석법에 따라 acetone precipitation method, 및 HPLC를 이용하여 인지질 함량 및 PC 함량 등을 검사하였다.

#### (2) 실험방법

##### (가) Alginate-silicate sol-gel matrix

알긴산(Alginic acid)의 염 형태인 Sodium Alginate 는 CaCl<sub>2</sub> 용액에 첨적 되었을 때 Alginate-Calcium 복합체를 형성하면서 불용성 겔(gel)을 형성하면서 침전한다. 이렇게 침전된 불용화 겔은 내부 네트워크 구조상에 효소를 담고 있는 역할을 함으로써 매우 경제적인 담체 역할을 한다.

보통 2% ~ 4%의 Sodium Alginate 용액을 CaCl<sub>2</sub>가 용해된 Water Bath 에 피펫, 또는 Nozzle, 시린지(syringe) 등을 이용하여 점적하면 불용화 된 겔 비드가 형성된다. 이렇게 생성된 비드는 Ca-Alginate gel로써 수분을 다량 함유하고 있다. 동결건조 등 건조처리를 한 후에는 bulk density 가 증가한다.

이렇게 생성된 bead는 훌륭한 담체 역할을 수행하지만, 반응 과정상에서 물리적 충격에 따라 효소가 조금씩 탈리될 수 있다. 따라서 이러한 단점을 극복하기 위해 Alginate 비드의 표면을 다양한 고분자 물질로 코팅함으로써 효소의 이탈을 방지할 수 있다.

Alginate bead의 crosslinking coating 기재로써 이용될 수 있는 물질 중에

6) Korea Brassica Genome Resource Bank; <http://www.brassica-resource.org>

는 Chitosan, Silica 등이 있다. Chitosan과 실리카는 모두 중합반응을 통해서 oligomer를 형성할 수 있는 물질들이다. 특히 실리카는 비드의 경도를 획기적으로 높이면서 비드의 물리적 저항력, 효소의 담체로써의 안정성 등을 끌어올릴 수 있는 것으로 알려져 있다. (Braun et al.) 실리카의 전구체 물질인 TMOS (Tetra-methylorthosilicate), 또는 TEOS (Tetraethylorthosilicate)는 Alginate gel의 표면 및 내면에서 sol-gel metrics를 형성하여 연약한 비드의 물리적 경도를 높이고, 효소의 이탈을 방지할 수 있는 crosslinking matrix를 형성한다.

Alginate-silicate Sol-gel matrix를 이용한 고정화 방법은 Heicharl-Segal 등<sup>7)</sup>의 방법을 일부 변경하여 적용하였다.

고정화 과정은 다음의 순서를 따라 진행되었다.

#### **1단계 : Ca-Alginate gel bead 생성**

액상효소(5~30mg solid/mL) 10mL를 2%(w/v) sodium alginate 25mL 용액과 잘 섞는다. 최소 1시간 이상을 교반한 sodium alginate/enzyme 용액을 10mL 시린지와 Coaxial orifice를 이용하여 0.2M CaCl<sub>2</sub> 용액에 점적한다. CaCl<sub>2</sub>용액은 Magnetic stirrer를 이용하여 약 150 ~ 300 rpm의 속도로 교반한다. 생성된 Gel bead들은 모두 Paper filter를 통하여 여과한다.

#### **2단계 : Alginate-Silicate sol-gel matrix 생성 반응**

생성된 Ca-Alginate gel bead 들을 100mL glass beaker 에 담고 N-hexane 적량을 부어서 bead들을 모두 잠기게 한다. 이어서 Silica의 전구물질인 TMOS(Tetramethoxyorthosilicate)를 bead와 비슷한 양을 취하여 20°C에서 12시간 이상 반응시킨다. 반응이 종결된 bead 들은 N-hexane 을 이용해서 세척한 후 glycerol 75% 수용액에 4시간 동안 침지시킨다. 침지가 끝난 bead 들은 여과를 거친 후 상온에서 7일간 경화과정(hardening)을 거친다.

---

7) Heicharl-Segal O, Rappoport S, Braun S. Immobilization in alginatesilicate sol-gel matrix protects beta-glucosidase against thermal and chemical denaturation. Bio/Technology 1995;13:798-800.

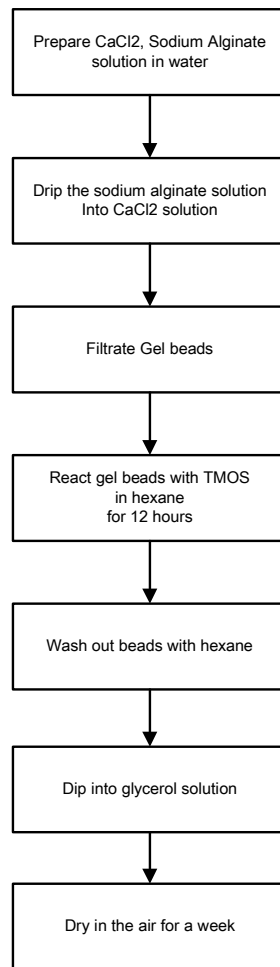


그림 36. alginate-silicate sol-gel matrix를 이용한 PLD의 효소 고정화 과정 다이어그램

(나) 공유결합법에 의한 효소 고정화

공유결합법 중 가장 널리 알려진 방법은 porous silica 또는 porous glass bead를 silanization을 거쳐서 표면에 Amine기(NH<sub>2</sub>)를 부착하여 고정화용 지지체의 표면을 functionalization한 후, 대칭적 구조를 가진 대표적인 물질인 Glutaraldehyde(GA)를 반응시켜서 단백질의 Free NH<sub>2</sub> 그룹이 지지체에 부착될 수 있도록 하는 것이다. GA는 지지체의 물리적 표면과 효소 사이를 잇는 가교제로써 훌륭한 역할을 수행하지만 반응에 참여하지 않은 Free GA 나, GA의 알데하이드 잔기 중 효소와 binding되지 않은 free 알데하이드기는 효소의 활성을 감소시킬 수 있다. 즉, 잔여 알데하이드기와 효소의 NH<sub>2</sub> 기가 Schiff-base를 형성하여 active site의 변형을 초래할 수 있다. 이러한 Schiff-base 형성을 막기 위한 방법들이 제시될 수 있는데 본

연구에서는 대표적인 reducing agent 중 하나인 sodium borohydride를 사용했다.

본 연구에서 사용된 covalent binding method는 Walsh 등<sup>8)</sup>에 의한 고정화 방법을 변형하여 이용하였다.

#### **1단계 : Silanization - introduction of NH<sub>2</sub> on the surface of carrier**

일반적으로 silanization은 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES) 또는 3-aminopropyltrimethoxysilane (APTMS)을 이용하여 amine기를 Silica 표면에 부착하는 과정으로, 이렇게 함으로써 다양한 organic material 이 쉽게 부착될 수 있도록 한다. 본 연구에서는 APTES를 사용하여 silanization을 수행하였으며, Silica gel(pore 60Å)을 Acetone을 용매로 하여 15%(w/v)의 APTES에 침지한 후 50℃에서 12시간 동안 Orbital shaker에서 반응시켰다.

#### **2단계 : Glutaraldehyde treatment - attachment of linker group**

silanization 반응이 종결된 silica gel을 여과한 후 Glutaraldehyde 2%를 포함한 50mM phosphate buffer(pH 6.5)에서 4시간 동안 상온에서 반응시켰다.

#### **3단계 : Attachment of enzyme**

적정량의 효소액(10mL for 1g silica gel)을 첨가한 후 4시간 동안 상온에서 반응시킨다.

#### **4단계 : Reduction by sodium borohydride**

반응이 종결된 silica gel에 sodium borohydride buffer 용액(50mM phosphate buffer, pH 6.5, sodium borohydride 700ppm)을 첨가하여 반응시킨 후 과량의 1M NaCl 용액(50mM phosphate buffer, pH 6.5)으로 silica gel을 세척하여 잔여 효소들을 씻어 내고, reaction buffer에 보관한다.

#### **(다) Crosslinked enzyme matrix bound to carrier**

단백질로 구성된 효소는 glutaraldehyde 와 같은 crosslinker 가 존재하는 환경에서 단백질 거대 분자 간의 가교화가 유도된다. 가교화의 정도와 최종적으로 가교화된 단백질의 크기 등은 GA의 첨가량, 반응 온도, 시간 등에 따라 다양하게 변화한다. 침전제 등을 이용하여 침전을 유도한 상태에서 각 화 할 경우 눈에 떨 정도의 크기(0.1mm~2mm) 까지 커질 수 있는 반면 수

---

8) SH Nam, MK Walsh. Covalent immobilization of bovine phospholipase A<sub>2</sub>. Journal of Food Biochemistry 2005; 29:11, 1-12, Blackwell Publishing.

용액 상에서 가교화 할 경우 눈에 띄지 않는 수준으로 유지될 수도 있다. 또한, covalent binding 방법에서 소개한 것 처럼, GA는 아민기를 가진 단백질 분자와 결합하여 Schiff-base를 형성하여 다른 지지체와 단백질 분자를 이어주는 spacer 역할을 수행할 수 있다.

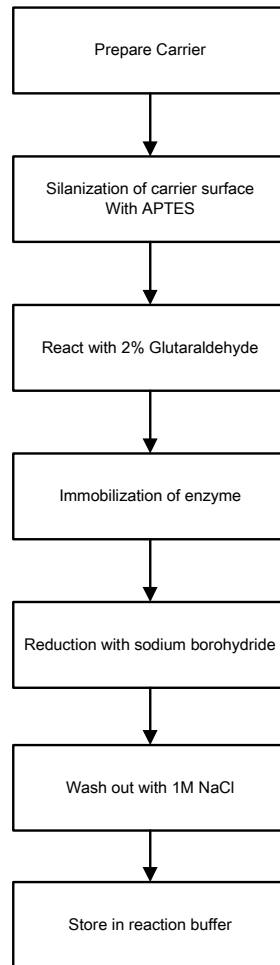


그림 37. Covalent binding 을 이용한 PLD 효소 고정화 과정 다이어그램

이러한 사실에 착안하여 Buffer 용액 상에 GA를 첨가한 다음 GA와 친화성이 높은 지지체(silica 기반의 bead)를 첨가한 후 장시간 교반을 수행하여 효소가 지지체 표면에서 GA에 의해 binding 되면서 동시에 단백질 분자간에는 가교화가 이루어져 지지체의 표면을 덮는 형식의 고정화 방법을 시도

하였다. 실험 방법은 다음과 같다.

#### 1단계 : 반응단계

silica gel(100um, non-porous) 2g, 효소용액(Buffer 혼합용액) 10ml 을 혼합한 다음 교반한다. 교반이 시작된 이후 GA를 점적하고 20시간 이상 교반을 수행한다. 교반 온도는 4°C 를 유지한다.

#### 2단계 : 수세단계

반응이 종료된 후 GA를 세척하기 위해 다량의 증류수로 세척한다.

#### 3단계 : Reducing 단계

Sodium-borohydride 가 첨가된 용액을 이용하여 1회 이상 세척한다.

#### 4단계 : 건조

### 나. 분석 방법

#### loading efficiency의 측정

loading efficiency 는 초기 고정화 반응에 투입된 효소가 고정화를 통해 carrier에 고정화된 양을 비율로 나타낸 것으로 아래의 식으로 나타낼 수 있다.

$$\text{Loading efficiency}(\%) = \left( \frac{C_i - C_f}{C_i} \right) \times 100$$

1)  $C_i$  = initial amount of protein in free enzyme

2)  $C_f$  = non-incorporated amount of protein to the carriers

loading efficiency 는 free enzyme 과 고정화 후 반응에 참여하지 못한 enzyme의 양을 각각 구하여 계산할 수 있다. 각각의 enzyme, 즉 protein의 양은 Bradford Assay를 이용하여 산출한다.

#### Immobilization yield의 측정

Immobilization yield 는 고정화를 통해서 carrier에 부착된 효소의 specific activity 의 정도를 나타낸 것으로 아래의 식으로 나타낼 수 있다.

$$\text{Immobilization yield}(\%) = \frac{A_m}{A_i} \times 100$$

1)  $A_m$  = specific activity (U/mg) of protein immobilized on the carrier

2)  $A_i$  = initial specific activity (U/mg) of free enzyme

Immobilization yield 는 loading efficiency 와 달리 고정화된 효소가 화학적 변성, poly peptide 구조 변경, mass transfer 와 같은 요소로 인해 고

정화된 효소의 단위 mg당 발현되는 활성도를 기준으로 하여 initial activity 가 어느 정도 까지 유지되는지를 보여주는 지표이다. 따라서 loading efficiency 가 우수한 결과를 보일지라도 immobilization yield 가 낮을 경우 활성도를 상당수 잃었다는 것을 의미한다.

### **Immobilization stability의 측정**

고정화된 효소의 안정성을 측정하기 위해 열, pH, multiple batch run 을 수행하고, 각각의 결과에 따른 thermal stability, pH stability, activity retention 을 알아본다. 또한, 상온조건에서 보관했을 때의 보존성을 알아본다. 각각의 안정성 지표는 활성도 테스트를 통해 initial activity 와의 비교를 통해 relative activity 로 표시한다.

## **3. 실험 결과 및 고찰**

### **가. 실험 결과**

#### **(1) Alginate-silicate sol-gel matrix 및 covalent binding**

##### **(가) 고정화 방법에 따른 loading efficiency 및 Immobilization yield**

고정화 방법별로 최적화 테스트를 통해 가장 우수한 효과와 효율을 보이는 조건을 스크리닝 하였다.

Alginate-silicate sol-gel matrix를 이용한 고정화 반응의 경우  $\text{CaCl}_2$  수용액과 Alginate 수용액 각각의 농도를 파라미터로 하여 영향을 분석하는 실험을 수행하였다.



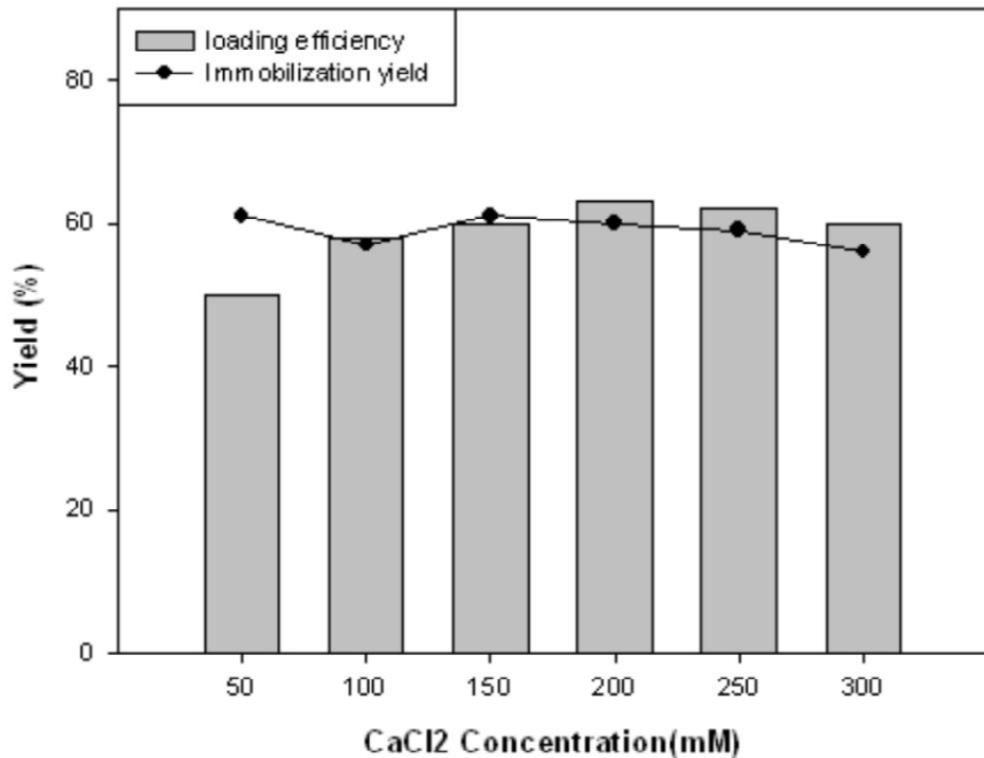


그림 38 고정화에 미치는 CaCl<sub>2</sub>의 영향.

반응조건 : Sodium Alginate solution 2%, enzyme solid 5mg/ml, Bead size 1.5mm

CaCl<sub>2</sub>의 경우 농도가 150mM, 200mM 일 때 비교적 가장 우수했고, Immobilization yield의 경우 150mM 이 다소 높은 결과를 보였다. 반면 효소의 loading efficiency 는 200mM 이 가장 우수한 결과를 보였다.

다음으로 Alginate 수용액의 농도를 달리하면서 고정화에 미치는 영향을 조사하였다. Alginate 의 농도가 증가할수록 다소 loading efficiency 가 증가하는 경향을 보였으나 상승폭은 크지 않았다. 반면, immobilization yield 는 큰 폭으로 감소하는 결과를 보였다. 이상의 결과로 볼 때 Alginate 와 Silicate 의 상호 crosslinking 네트워크가 좀 더 조밀해지면서 고정화 carrier의 표면으로부터 내면으로의 물질전달이 어려워지면서 기질의 diffusion rate 이 감소한 것으로 추정된다.

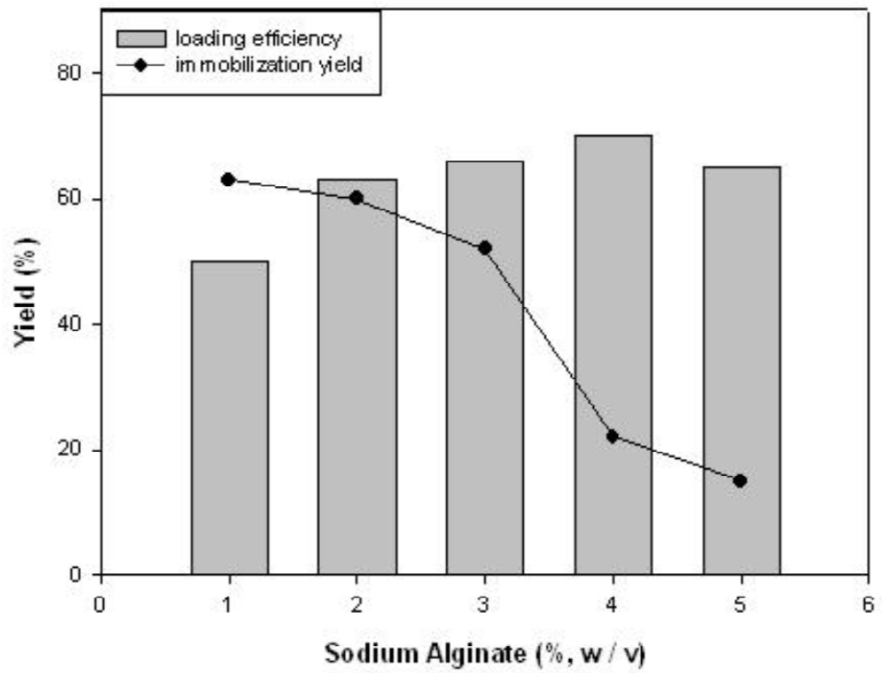


그림 39. 고정화에 미치는 Sodium Alginate 농도의 영향.  
 반응조건 : CaCl<sub>2</sub> 200mM, enzyme solid 5mg/ml, Bead size 1.5mm

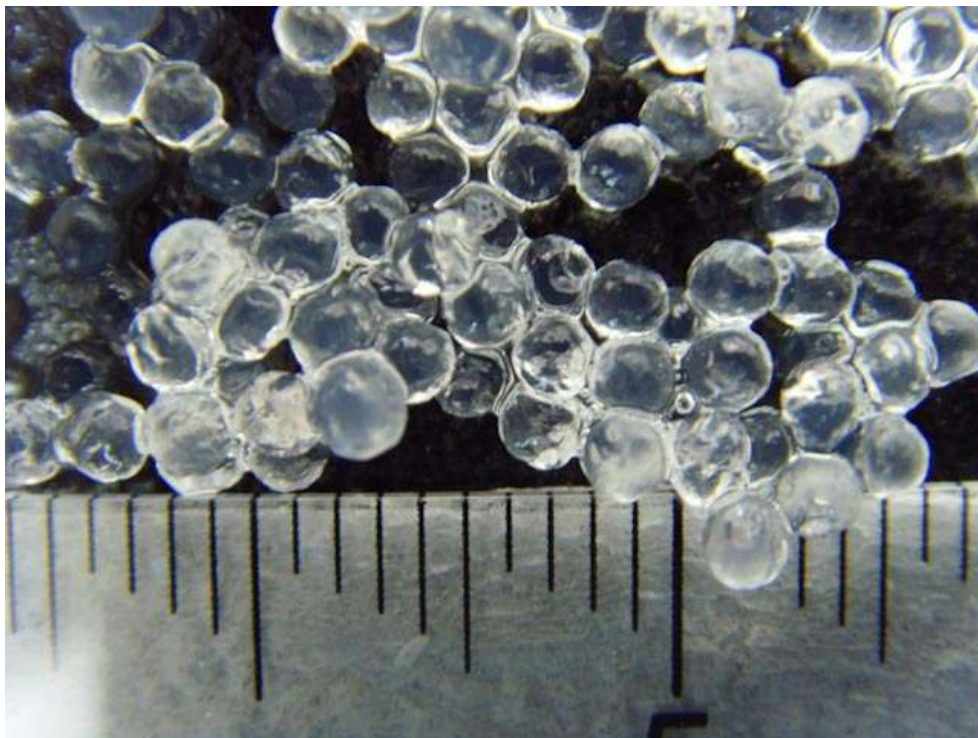


그림 40. Alginate-silicate sol-gel matrix bead after hardening

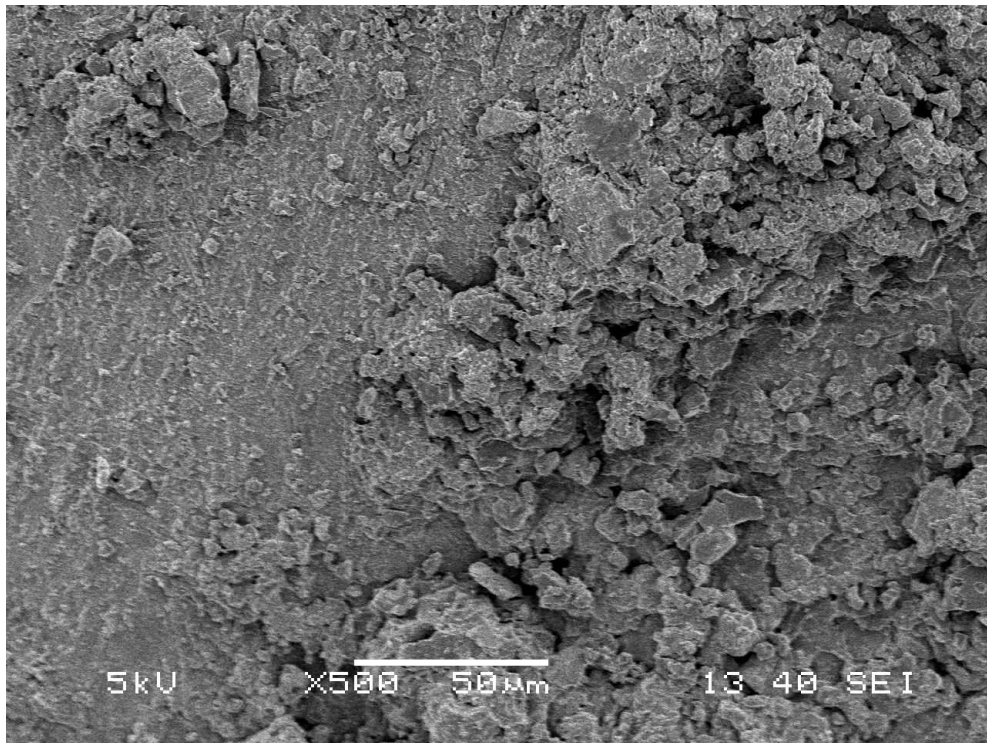


그림 41. Alginate-silicate sol-gel matrix 비드의 표면 SEM(scanning electron microscopy) 이미지

공유결합법을 이용한 고정화 반응에서는 아민실란기를 담체의 표면에 부착하기 위한 반응인 silanization 반응에 사용되는 3-APTES (3-amino propyltriethoxysilane)의 농도에 따른 영향과 reducing agent를 통한 GA (glutaraldehyde)의 shiff base 제거를 통한 활성화 확보 확인에 실험의 중점을 두었다.

특히, 공유결합법의 경우 효소의 불활성화가 예상되기 때문에 효소의 loading efficiency 보다 immobilization yield를 높이기 위한 조건을 찾는 것이 중요하다.

먼저, 다양한 농도의 silanization agent (3-APTES)를 투입한 결과를 점검하였다. 전반적으로 용매로 쓰인 아세톤의 10%(w/v)에서 30% 범위 내에서는 효소가 고정화되는 비율이 큰 차이를 보이지 않았다. 최적 조건은 고정화 수율, 즉 비활성도가 가장 높게 나타난 20% 농도인 것으로 나타났다.

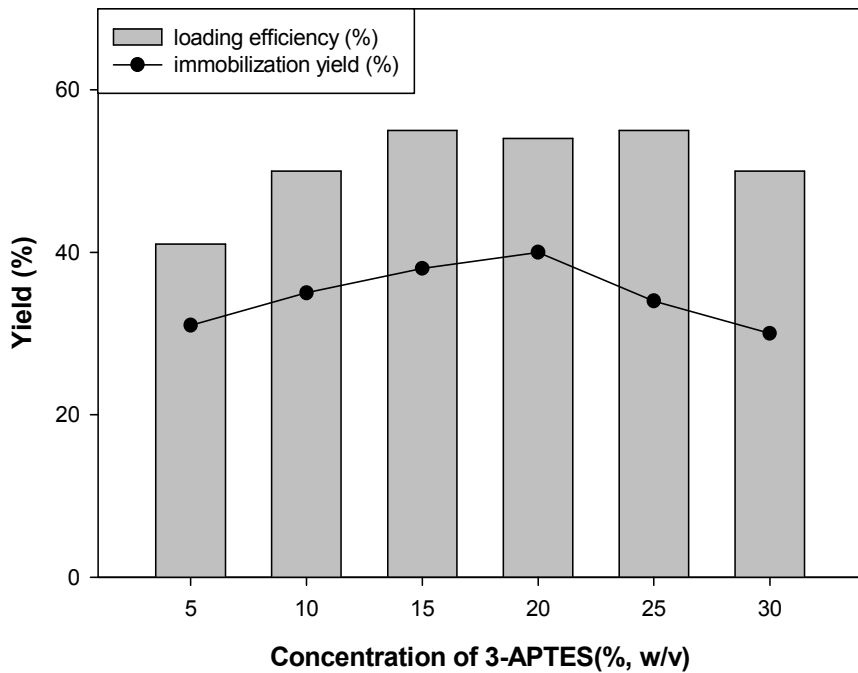


그림 42. 실란화 반응에서 3-APTES의 첨가량이 미치는 영향. 용매로는 Acetone을 사용하였으며, 2시간 동안 50℃에서 반응하였다.

다음으로는 reducing agent로 사용된 sodium borohydride의 효과를 알아보기 위해 처리군과 미처리군 각각 10 건의 샘플을 취하여 silica gel 1g당 total activity를 기준으로 통계 처리한 결과이다. 이때 3-APTES는 모두

15%의 농도로 처리하였다.

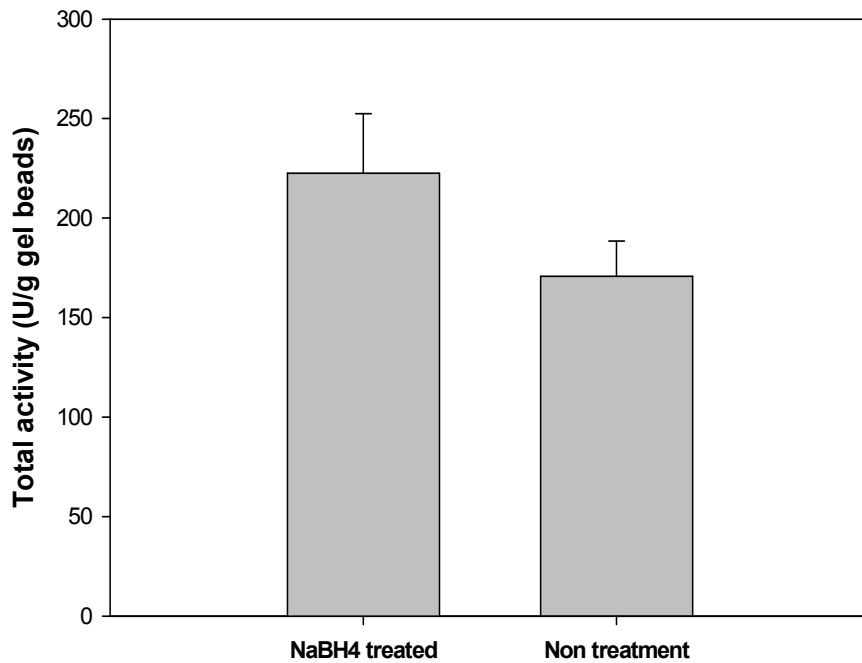


그림 43. 고정화 후 sodium borohydride에 의한 reducing 처리가 미치는 영향.

반응 횟수 N=10; NaBH4 처리군의 평균 활성도 = 220 U/g gel beads, 비처리군=1.7 U/g gel beads

각각 1g의 gel bead를 첨가하여 기질 1g과 1시간 동안 반응한 결과 NaBH4를 이용한 reducing 프로세스가 전체 활성도를 20% 이상 증가시킨다는 것을 알 수 있다. 즉, 잔여 알데하이드기가 효소와 Schiff base를 형성하지 않도록 함으로써 효소의 화학적 변성을 막고, 반응에 참여할 수 있는 효소의 active site를 늘림으로써 활성도를 좀 더 높게 유지할 수 있음을 확인할 수 있었다.

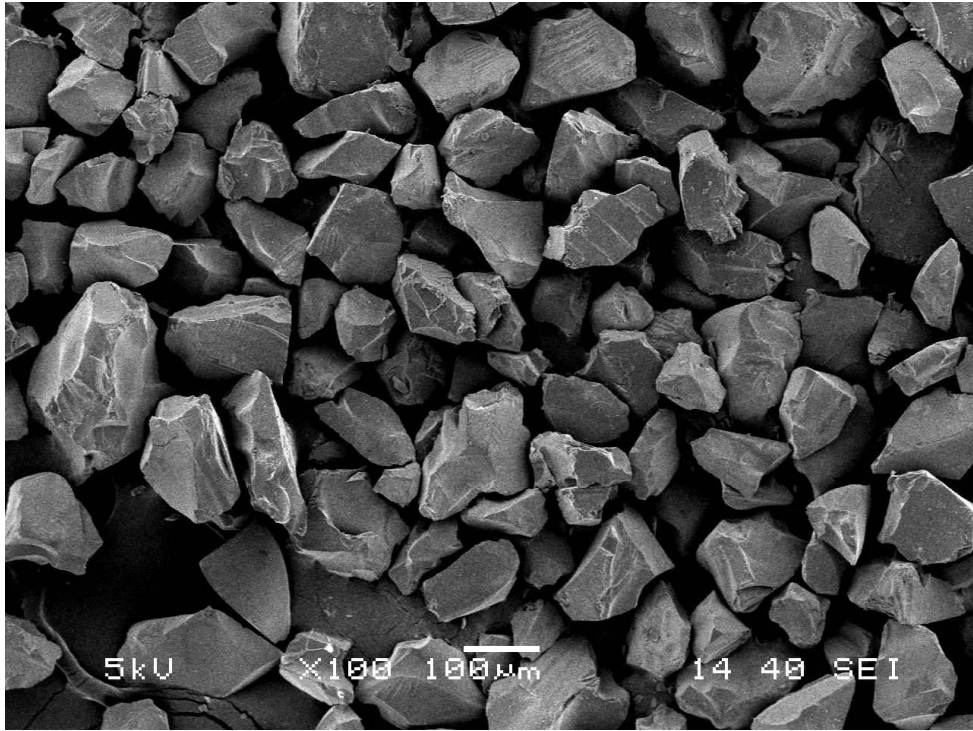


그림 44. SEM image of PLA2 with covalent binding method



그림 45 Immobilized PLA2 using Crosslinked enzyme matrix bound to silica method

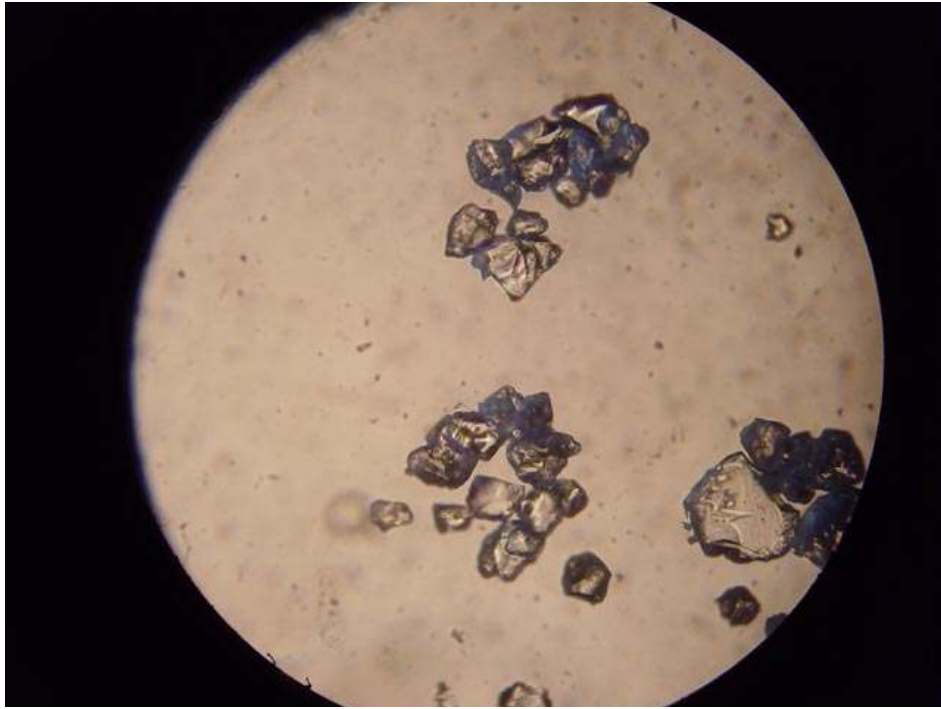


그림 46 Optical microscopic image of immobilized PLA2 using Crosslinked enzyme matrix bound to silica method (magnification : x160)



그림 47 Optical microscopic image of immobilized PLD using Crosslinked enzyme matrix bound to silica method (magnification : x160)

(라) 고정화 방법에 따른 고정화 효소의 안정성 비교

### Activity stability over recycled runs

현재 까지 테스트한 두 가지 형태의 고정화 방법을 이용한 고정화수율 및 고정화 효율 데이터를 기반으로 반복적인 사용을 했을 때 효소의 활성도 감소율을 알아보기 위해 4차례의 batch run을 통해 결과를 관찰했다.

절대적인 활성도는 Silicate-Alginate sol-gel matrix를 이용한 고정화 비드가 우월하였으나 반복적 사용에 따른 활성도 감소율 면에서는 공유결합법이 다소 우수한 결과를 보였다.

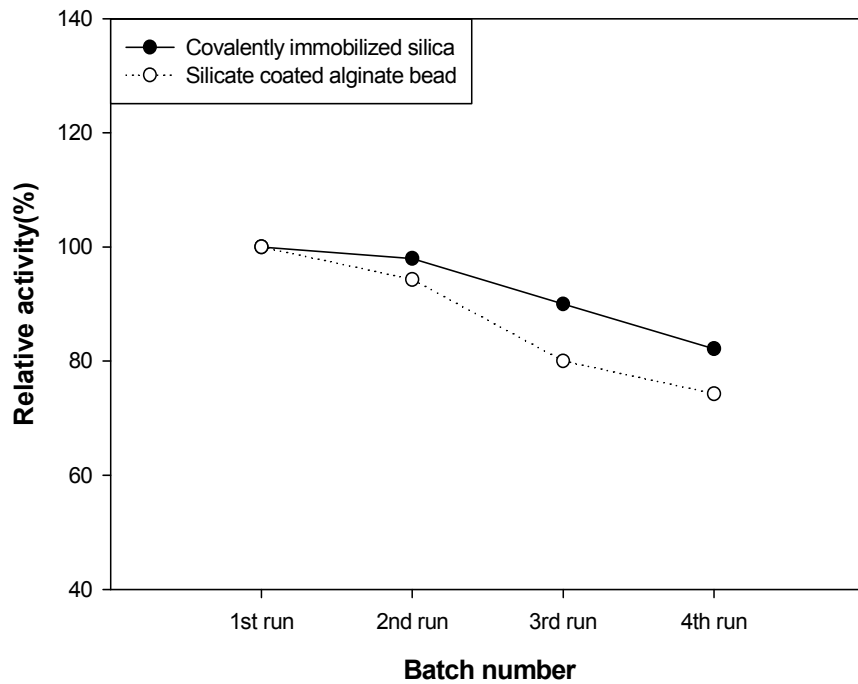


그림 48. 4회 연속 사용에 따른 상대 활성도의 변화



Batch no.	Covalently immobilized silica		Silicate-alginate sol-gel matrix	
	Activity†	relative activity	Activity	relative activity
1st	2.8	100.0	3.5	100.0
2nd	2.77	98.0	3.3	94.3
3rd	2.52	90.0	2.8	80.0
4th	2.3	82.1	2.6	74.3

표 14. 고정화 효소의 반복 사용에 따른 활성도 및 상대 활성도의 변화

†Measured as Unit/min/g beads

lab-scale, 특히 기질 1g을 기준으로 한 반응실험을 수행하였고, magnetic stirrer를 이용한 회분식 반응기를 통해 보았기 때문에 실제 공정에 적용하였을 때 안정성 데이터가 절대적이라고 볼 수는 없을 것이다. 그러나 공유결합법의 장점인 효소의 이탈방지 라는 점은 확인할 수 있었다. 그러나 Silicate-alginate sol-gel matrix 의 경우 조건을 좀 더 최적화 한다면 안정성을 더 확보할 수 있을 것이라는 여지를 주고 있다.

## (2) Crosslinked enzyme matrix bound to carrier

Crosslinked enzyme matrix bound to carrier, 즉 효소간 가교화와 함께 지지체로의 공유결합을 동시에 유도한 방법은 GA 와 지지체(실리카겔), 효소간 친화성, 그리고 GA의 독성에 대한 효소의 안정성이 핵심 변수로 작용하였다.

GA(glutaraldehyde)의 농도가 100mM 이 넘어갈 경우 대부분의 경우 효소의 활성도가 사라졌다(data not shown). 따라서 효소 들에 따른 적정량의 GA첨가량을 결정하는 것이 중요하므로 다양한 농도의 GA 를 첨가한 다음 효소의 활성을 신속하게 확인하여 실험의 복잡성을 줄이도록 했다.

그 결과 PLA2 의 경우 효소 용액 1ml 에 GA 함량이 2mg~5mg 의 수준이 되도록 유지하는 것이 적절함을 알 수 있었다.

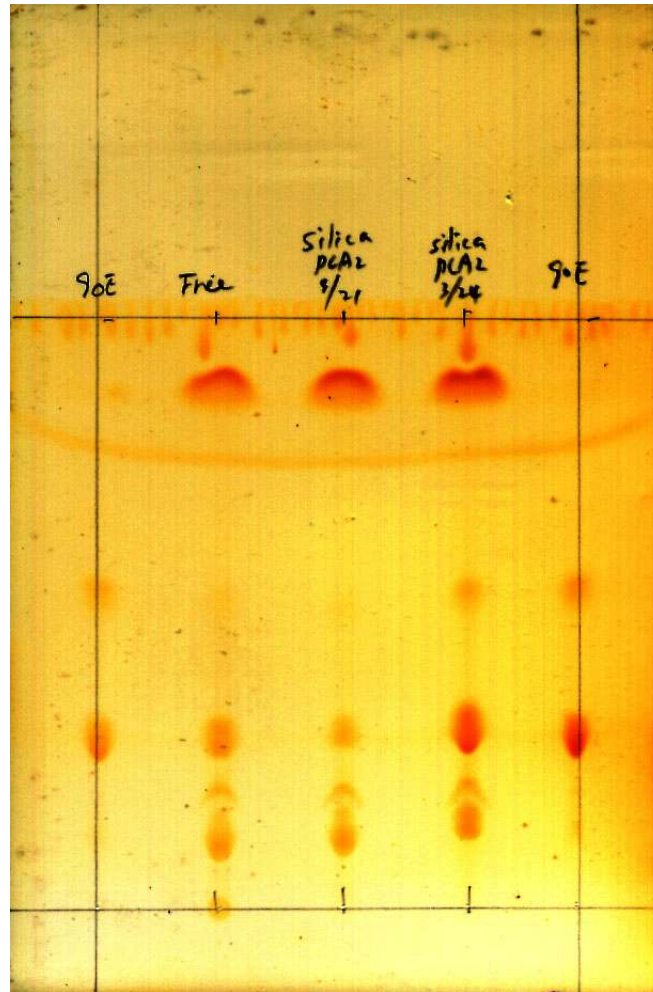


그림 49 hydrolysis reaction by crosslinked enzyme matrix to silica of PLA2  
 lane 1,5: marker-GL-90E, lane 2: free enzyme ,  
 lane 3, 4 : immobilized PLA2

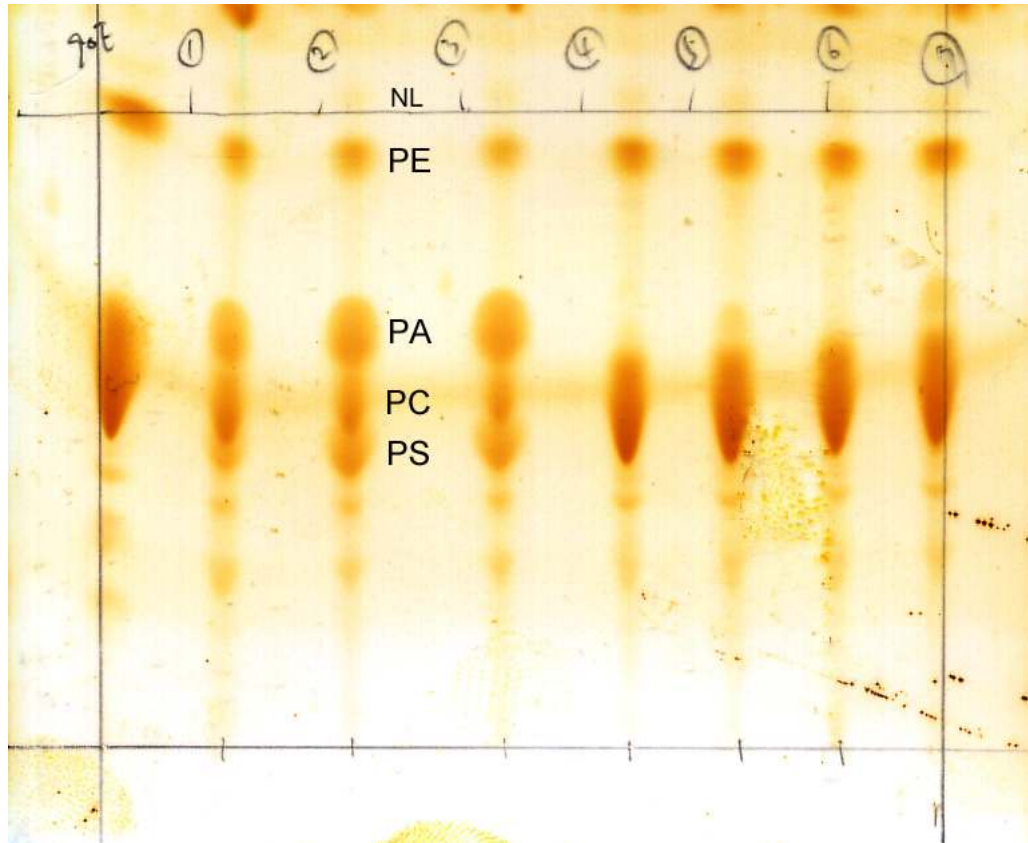


그림 50. Transphosphatidyl transfer reaction by crosslinked enzyme matrix to silica of phospholipase D (chinese cabbage, prepared by the lab of Goshenbiotech, Inc.) immobilized at different pH and GA (glutaraldehyde) addition. Reaction time : 20 hrs at 50°C, 200 rpm

lane 1 : market - GL-90E

lane 2 : pH 4.6 sodium acetate buffer 50mM, GA 25% 20ul in enzyme 5ml

lane 3 : pH 5.6 sodium acetate buffer 50mM, GA 25% 20ul in enzyme 5ml

lane 4 : pH 7.5 Tris-HCl buffer 50mM, GA 25% 120ul in enzyme 5ml

lane 5 : pH 4.6 sodium acetate buffer 50mM, GA 25% 120ul in enzyme 5ml

lane 6 : pH 5.6 sodium acetate buffer 50mM, GA 25% 120ul in enzyme 5ml

lane 7 : Marker - GL-90E

그림 32 에서 보여지는 것처럼, 상대적으로 저렴하고 단순한 고정화 방법을 이용하여 free enzyme 에 비하여 높거나, 비슷한 활성을 유지할 수 있었다. 활성 테스트 결과 최종적으로 immobilization yield 는 91% 까지 달성되었으며, 10회(24시간 반응) 테스트 결과 초기 활성의 80% 까지 유지할 수 있었으며, 유기용매(클로로포름, 메탄올)로 인한 활성 저하가 매우 미미함을 확인할 수 있었다.(data not shown)

같은 방법을 사용하여 배추에서 추출한 PLD 의 고정화도 시도를 하였다. PLD 의 경우 반응 시스템이 pH 5.6에서 수행되기 때문에 고정화에 pH 가 미치는 영향을 조사하기 위해 pH 4.6, pH 5.6, pH 7.5 로 나누어 실험을 수행하였다. 그 결과 그림 33에서 보여지는 것처럼 pH 에 의한 영향은 크지 않으며, PC 스팟이 가장 적게 형성된 pH 7.5 가 적절한 것으로 보여졌다. PLD 의 단백질 함량이 30mg/ml 정도에 이르는 것으로 조사되었다. TLC 분석에서 보여지는 것처럼 단백질 30mg 에 대하여 Glutaraldehyde 용액(25%) 4ul 로도 충분히 반응을 수행할 수 있는 것으로 나타났다. 이와 같은 방법을 이용하여 immobilization yield 73%, 10회(24시간 반응) 재사용 테스트 결과 초기 활성의 65% 까지 유지할 수 있었다. PLD 의 경우 PLA2 의 비해 안정성이 부족함을 관찰할 수 있었다.

#### 4. 결론

랩스케일에서 국산배추로부터 정제된 phospholipase D, 상업화된 PLA2(Lecitase 10L, Novozyme)를 다양한 지지체에 고정화 하고 활성 및 안정성 테스트를 수행하였다. 흡착법, 포괄법, 결합법 중 효소의 life span 이 길고 안정적이라고 인정되는 포괄법과 결합법을 중심으로 연구를 진행하였으며, Alginate gel bead 에 silica를 crosslinking시킨 Aliginate-silicate sol-gel matrix bead와 공유결합법, 공유결합과 GA에 의한 crosslinking 방법을 응용한 고정화 방법을 구체적 실험방법으로 수행하였다.

본 연구를 통해 최종적으로는 PLA2의 경우 immobilization yield 90% 이상, 10회 사용 후 초기 활성도 80%를 유지하는 Crosslinked enzyme matrix bound to carrier 방법을 달성하였다. PLD의 경우 immobilization yield 70% 이상, 10회 사용 후 초기 활성도 60% 이상을 유지하는 고정화 메소드를 확립하였다.

Alginate-silicate sol-gel matrix 및 공유결합법은 매우 훌륭한 고정화 메소드로써의 장점들을 보여주었지만, 두 방법 모두 고정화 과정이 오래 걸리고 고려요소가 매우 다양하다는 단점을 지니고 있다.

반면 crosslinking 과 공유결합법을 혼합한 방법을 이용하여 24시간 내에 모든 고정화 과정이 완료되며, 매우 높은 활성이 유지될 수 있는 방법을 개발, 확립하였다.

본 방법은 간단한 장치와 재료, 복잡하지 않은 공정 특성을 가지고 있어 재현성 및 scalability 가 높아서 산업화가 매우 용이하며, 지지체인 silica gel 의 물리적 강도가 높고 회수방법이 간단(여과, 원심분리)하여 현장 적용성이 매우 높다.

## 제4절 PS 생산-양배추 PLD 이용

### 1. 서론

세포막 내의 지질은 한 분자 내에 두 개의 상반된 특징을 동시에 보유하고 있다. 친수성인 한 개의 머리와 소수성인 한두 개의 탄화수소 꼬리를 가지고 있다. 그러므로 양친매성의 성질을 가진다. 가장 풍부한 막지질은 인지질로 글리세롤에 인산기와 두 분자의 지방산이 결합된 형태이며, 친수성의 머리 부분의 끝은 인지질 군에 따라 특이한 head group을 갖는다.

인지질은 뇌와 간에 많이 함유되어 있으므로 신경전달이나 효소계의 조절 작용에 중요한 역할을 하는데, 특히 포스파티딜세린(phosphatidylserine, PS), 포스파티딜글리세롤(phosphatidylglycerol, PG) 등의 인지질은, 각각 유용한 생리작용이나 특이한 물성을 갖고 있어, 의약품이나 식품소재, 유화제 등의 용도로 사용되고 있다. 예를 들면, 인지질 영양소인 포스파티딜세린은 뇌 세포막에서의 주요 산성 인지질 성분으로 막 관련 신경세포 과정에서 결정적인 역할을 수행한다. 그러므로 PS는 노인성 치매증이나 기억장애 등의 예방이나 치료 등을 목적으로 한 약제로서의 이용이 기대되고 있다. 더불어 PS는 인지 장애가 없는 이들의 인지를 최적화하는 것도 도울 수 있다. 또한 식이성 PS는 효과적으로 빠르게 장에서 흡수되고, 혈액에 용해되고, 혈뇌 장벽을 용이하게 가로질러 뇌에 있는 신경 세포에 도달한다.

이러한 포스파티딜세린은 동물의 조직에 널리 분포되어 있으나 대개 인지질의 8% 이하로 비교적 그 양이 적으므로, 자연계로부터 대량의 PS를 순수 분리정제하기에는 상당한 어려움이 따른다. 또한 PS의 화학적 합성은 대량생산이 가능하고 원하는 지방산을 인지질에 함유하게 할 수 있는 장점이 있는 반면, 그 공정이 매우 복잡하고 길며 많은 노동력과 생산비가 요구된다. 그리고 PS의 분리정제를 위한 많은 방법이 보고되어 있으나 대부분은 산업적 규모의 생산에 있어서 한계점을 가진다. 따라서 PS생산을 위한 보다 저렴하고 간편한 방법을 모색하기 위해 효소적 생산방법에 관한 연구가 많이 이루어졌다. 이는 대두 또는 난황 등의 레시틴으로부터 생촉매 작용을 이용하여 제조하는 방법이며, 포스포리파제 D(phospholipase D, PLD)와의 포스파티딜화 반응(transphosphatidylation)을 이용함으로써 인지질의 head group이 개질된다.

PLD는 포스파티딜콜린(phosphatidylcholine, PC)을 반응 시작물질로 하여 glycerol 또는 serine과 같은 hydroxyl기를 포함하는 알코올과의 포스파티딜화 반응 또는 물로 인한 가수분해 반응을 촉매 하여, PC를 PS 또는

PG, PA 등으로 전환시킨다. PS 생성을 위한 반응 시스템에서 반응 기질인 지질(lipid)이 수용액에서 리포솜을 형성하여 효소 내에 존재할 경우 효소 활성이 저하되는 점과 기질인 지질이 물에 불용성이라는 점으로 인해 유기용매 또는 계면활성제가 전형적으로 요구된다. 따라서 효소와 수용체인 세린이 녹아있는 수용액과 지질이 녹아있는 유기용매를 포함하는 이상계 시스템이 일반적으로 사용되며, 이때 효소반응은 물과 유기용매 사이의 표면(interfacial area)에서 일어난다. 그러나 대부분의 의약품과 식품의 생산에 있어 계면활성제와 유기용매의 사용은 문제시 되고 있다. 특히 헥산과 에틸아세테이트를 제외하고는 모두 식품용으로 사용할 수 없는 비교적 독성이 큰 용매들이고 유기용매 사용에 의한 효소의 불활성화가 심하여 효소 재사용 등이 어렵다는 단점이 있다. 따라서 이러한 문제점을 해결하고자, 본 연구에서는 완충용액만을 이용한 비 유기용매 시스템을 적용하여 독성 유기용매를 사용하지 않을 뿐만 아니라 효소의 불활성화도 심하지 않으며 동시에 높은 반응효율로 안전하게 PS를 합성하도록 한다. 그러나 균일상 반응에서는, 반응계에 다량의 물이 존재하기 때문에, 반응을 계속하면 포스포리파제 D가 갖는 가수분해활성에 의해, 부반응생성물로서의 포스파티딕산(Phosphatidic acid; PA)이 생성되어 버린다. 그러므로 포스파티딜화 반응 결과물로의 전환을 증가시키는 방법을 찾는 것이 중요하다.

## 2. 실험재료 및 방법

### 가. 실험재료

실험에 사용된 효소는 Cabbage, *Streptomyces* sp., *Streptomyces chromofuscus*, Peanut유래의 서로 다른 4종의 상업적으로 판매하고 있는 PLD와 실험실에서 배추로부터 직접 추출한 효소를 사용하였다. 순도 99%의 난황포스파티딜콜린(Egg phosphatidylcholine, Egg PC, Sigma Aldrich)과 인지질 함량 90%인 GL-90E(난황 인지질, (주)고센바이오텍), 인지질 함량 60%인 DL-60(대두 인지질, Solae Inc.)이 기질로 사용되었으며, GL-90E와 DL-60의 인지질 조성은 표15 과 같다.

표 15 GL-90E와 DL-60의 인지질 조성

Product	PC(%)	PE(%)	PS(%)	PA(%)	PI(%)	SM(%)	LPC(%)
GL-90E	76.5	10.35	0.81	-	-	1.53	1.35
DL-60	39.5	28.1	-	9.7	19	-	-

L-Serine은 독일 Degussa로부터 구입하였으며, 포스파티딜에탄올아민(phosphatidylethanolamine, PE), 포스파티딜세린(phosphatidylserine, PS), 포스파티딕산(phosphatidic acid, PA), 스피링고마이엘린(sphingomyeline, SM), 라이소포스파티딜콜린(Lyso-phosphatidylcholine, LPC) 등의 인지질 표준물질은 Avanti사의 것을 사용하였다. Sodium acetate trihydrate, CaCl<sub>2</sub>, CaSO<sub>4</sub>는 Sigma사의 것을 사용하였으며, PLD 추출 시 사용된 아세톤 및 에탄올은 EP급을 사용하였다. 전이반응 후 인지질 추출 및 HPLC 분석에 사용된 용매는 chloroform, methanol 등으로 HPLC급을 사용하였다. 또한 silica gel은 Merck사의 70~230mesh의 것과 particle size 15um인 것을 사용하였으며, 계면활성제는 모두 SAMCHUN으로부터 구입하였다.

#### 나. 포스파티딜기 전이반응의 조건 탐색

PLD는 PC를 지용성인 PA와 수용성인 콜린(choline)으로 가수 분해시키는 반응을 촉매 할 뿐만 아니라 포스파티딜기를 다른 알코올성 수용체에 전이시키는 반응을 촉매 한다. 이러한 반응을 포스파티딜기 전이반응(transphosphatidyltion)이라 하며, PC를 수용체인 세린과 반응시켜 고기능성 인지질인 PS를 합성할 수 있다. PS 합성에 관여하는 주요 인자로는 수용체의 농도, 흡착제의 종류 및 첨가량, 염의 농도, 기질의 종류 등이 있으며, 이러한 인자들의 최적 조건을 알아보기 위해 다음과 같이 반응을 진행하였다.

기질인 GL-90E(난황 인지질, (주)고센바이오텍)를 L-serine과 CaCl<sub>2</sub>를 포함하는 50mM Sodium acetate buffer(pH 5.6)에 녹여 15분간 Sonication하여 기질용액으로 사용하였다. 반응 시간을 20시간으로 하여 효소의 반응 온도, pH, 흡착제, 기질의 종류 및 농도, CaCl<sub>2</sub>의 농도 등의 조건을 여러 가지로 변화시켰다. 반응 용기로는 10ml 유리병이 사용되었고, 반응기로 교반기와 자석젓개가 사용되었으며 교반속도는 600rpm으로 조절하였다. 효소



를 첨가함으로써 반응이 시작되었으며, chloroform: methanol(1:1, v/v) 용액 16ml를 가하여 효소반응을 중지시켰다. 또한 4ml의 증류수를 가하여 혼합한 후 5000rpm으로 5분간 원심 분리한다. 이를 분별 깔때기로 옮겨 30분 동안 방치한 다음 Chloroform 층을 취하여 용매를 기화시켰으며, 농축된 인지질은 chloroform으로 다시 녹여 HPLC로 분석하였다.

#### 다. PLD 상업화 효소의 포스파티딜기 전이반응

기질인 Egg PC(Sigma Aldrich) 40mg을 25%의 L-serine(w/w)과 50mM CaCl<sub>2</sub>를 포함하는 50mM Sodium acetate buffer(pH 5.6)에 녹여 15분간 Sonication하여 기질용액으로 사용하였다. 서로 다른 4종의 상업화된 PLD 100U와 silica gel 0.8g을 첨가하여 40℃에서 4시간 동안 반응하였다. 반응 용기로는 10ml 유리병이 사용되었고, 반응기로 교반기와 자석젓개가 사용되었으며 교반속도는 600rpm으로 설정하였다.

#### 라. HPLC/ELSD에 의한 인지질 분석

기질로 사용되는 인지질의 조성 및 PLD 효소와의 반응 후 변화된 인지질의 조성을 분석하기 위해 ELSD 검출기가 장착된 액체크로마토그래프를 사용하였다. 분석용 column으로는 Alltima HP silica column (10cm length, 4.6mm ID, 3µm particle size)을 사용하였다. 시료의 분리를 위한 용매와 분석조건 및 인지질 표준물질 크로마토그램은 표 2와 그림 1에 나타내었다.

#### 마. TLC에 의한 인지질 분석

분석하고자 하는 인지질을 클로로포름에 4mg/ml이 되도록 용해시킨 뒤 샘플을 실리카겔 TLC판에 올린 후 Chloroform: Methanol: Ammonium hydroxide (65: 25: 4, v/v/v)를 전개용매로 하여 10cm 전개시킨다. TLC판을 건조시킨 뒤 요오드 증기를 이용하여 발색시킨 다음 표준시약과 비교하여 동정한다.

### 3. 실험결과 및 고찰

#### 가. 포스파티딜기 전이반응의 조건 탐색

##### (1) 기질의 영향

포스파티딜기 전이반응(transphosphatidylation)에 있어 PC(phosphatidylcholine)의 공급원으로써 상이한 인지질을 사용하였을 때 미치는 영향을 조사하기 위해 시행한 실험에서는 양배추 유래의 PLD를 이용하여 각각의 기질에 따라 생성된 PS의 양을 비교하였다. 기질 40mg을 50mM CaCl<sub>2</sub>와 35%(w/w)의 L-seine을 포함한 50mM Sodium acetate buffer(pH 5.6)에 녹여 15분간 sonication 한 것을 기질 용액으로 사용하였다. 100U의 효소와 silica gel 0.8g을 첨가하여 4시간동안 반응하였다.(표 16) 순수한 PC를 기질로 하였을 경우 PS 생성율이 25.6%로 가장 높았고, GL-90E(난황 인지질, (주)고센바이오텍)의 경우 16.1%의 PS가 생성되었다. 또한 대두인지질의 경우 PI를 많이 포함하고 있어 상대적으로 PC함량이 낮아 12.4%로 가장 적은 함량의 PS가 생성되었다. PC의 함량이 높은 기질의 사용이 PS로의 전환율을 높일 수 있으므로 순수한 PC를 기질로 사용하는 것이 좋으나 고가라는 단점이 있다. 그러므로 본사의 GL-90E로부터 PC를 분리하는 방법을 탐색하고, 이를 기질로 이용하는 것이 바람직하다.

표 16 기질의 종류에 의한 PS 생성율

Substrate	PC(%)	Converted PS (%)	Converted PA (%)
Egg PC	> 99	25.6	60.1
GL-90E (acetone precipitate)	> 84	16.1	33.1
Soy PL (acetone precipitate)	> 39	12.4	38.8

## (2) 온도의 영향

양배추 유래의 PLD를 이용하여 반응 온도에 따라 생성된 PS의 양을 비교하였다. 반응 온도가 높아질수록 PA의 생성량은 줄어드는 반면 PS의 생성량이 증가하여 좋은 결과를 얻을 수 있었으며, 특히 50°C에서 반응했을 경우 PS로의 전환을 31.5%로 가장 높았다. (그림 51) 60°C 이상의 온도에서는 인지질이 변성, 분해될 우려가 있으므로 60°C가 상한이라고 생각되며, 50°C가 가장 적합하다.

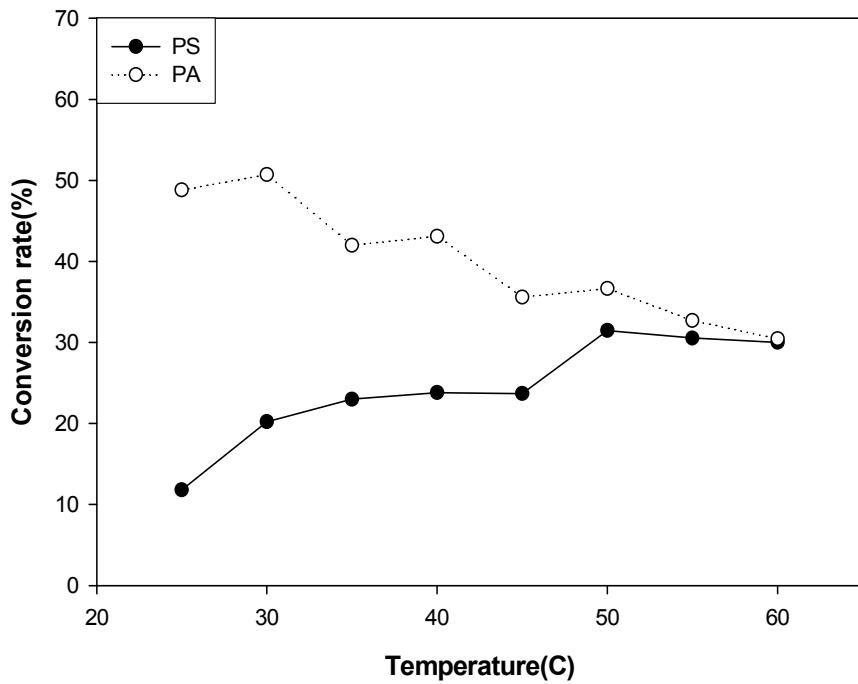


그림 51. 온도에 의한 PS 생성율

### (3) 흡착제의 영향

양배추 유래의 PLD를 이용하여 인지질에 대한 흡착제의 종류 및 비를 달리하여 생성된 PS의 양을 비교하였다. 흡착제를 첨가하지 않을 경우 포스파티딜기 전이반응이 일어나지 않았고, CaSO<sub>4</sub>의 경우 PS 생성반응에서 좋은 흡착제로 쓰이고 있지만, 본 실험에서는 silica gel을 사용하였을 때의 결과가 더 좋았으며, 입자가 미세한 silica gel 이 약 5% 정도 더 높은 전환율을 보였다. (표 17) 그러나 미세한 silica gel을 사용할 경우 수분을 다 흡수하여 교반하는 데 어려움이 있으므로 이를 사용하려면 더 많은 반응용액을 사용하여야 한다.

Silica gel의 첨가량을 달리하여 40°C에서 20시간동안 각각 반응한 결과 인지질 무게 대비 25배의 silica gel을 사용한 경우 전환된 PS의 함량이 가장 높았다.(그림 52) 인지질 대비 30배의 silica gel을 사용할 경우 PS 생산율이 저하되었고, 또한 교반하는 데도 어려움이 있었다. 그러므로 PS를 생성하는 데 있어 흡착제의 사용이 요구되며, 인지질의 무게 대비 25배의 silica gel(70~230mesh)의 사용이 적합하다.

표 17 흡착제 사용에 의한 PS 생성율

Adsorbent	Converted PS(%)	Converted PA(%)
No adsorbent	-	-
Silica gel (70~230mesh)	25.6	60.1
Silica gel (particle size 15um)	30.2	55.4
CaSO <sub>4</sub>	13.1	39.9

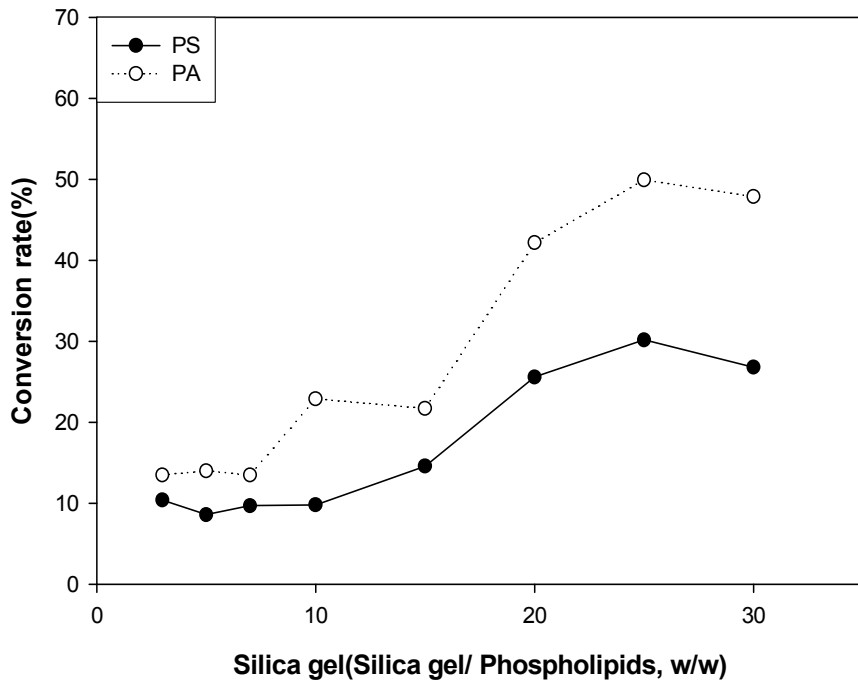


그림 52. Silica gel의 농도에 의한 PS 생성율

#### (4) 수용체 농도의 영향

양배추 유래의 PLD를 이용하여 L-serine의 농도에 따라 생성된 PS의 양을 비교하였다. L-serine의 농도가 증가할수록 PS의 생성량은 증가하는 반면 PA의 생성량은 감소하였다.(그림 53) 그러나 50%(w/w) 이상의 L-serine을 사용할 경우 다량의 세린이 반응 액에 용해되지 않았고, PS 생성율 또한 저하되었다. 그러므로 35~40%(w/w)의 L-serine 용액이 반응 액으로 적합하다고 사료된다.

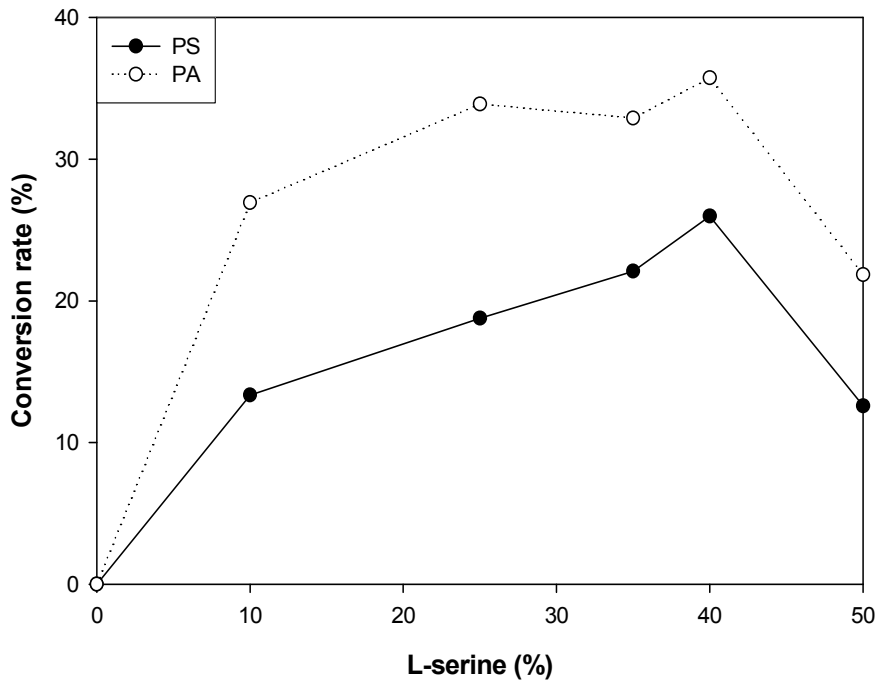


그림 53. L-serine의 농도에 의한 PS 생성율

#### (5) 유화제 및 계면활성제의 영향

포스파티딜기 전이반응에 사용되는 기질인 지질의 불용성으로 인해 PS의 전환율이 저하될 수 있으므로 계면활성제를 첨가하여 PS 생성반응을 수행하였다. 양배추 유래의 PLD를 이용한 PS 생성반응에서 Tween 80, Triton X-100, sorbitan monostearate를 첨가하여 그 결과를 비교하였다. Tween 80을 첨가하였을 경우 생성된 PS가 30%로 가장 높았다. 그러나 의약품과 식품의 생산에 있어 계면활성제의 사용은 문제시 되므로 이를 사용하지 않는 방법을 선택하도록 한다.

#### (6) Time course

양배추 유래의 PLD를 이용하여 반응 온도에 따라 생성된 PS의 양을 비교하였다. 40mg의 기질로부터 최대의 PS를 생산하기 위해서는 30시간 이상의 반응시간을 필요로 함을 확인하였다. (그림 54)

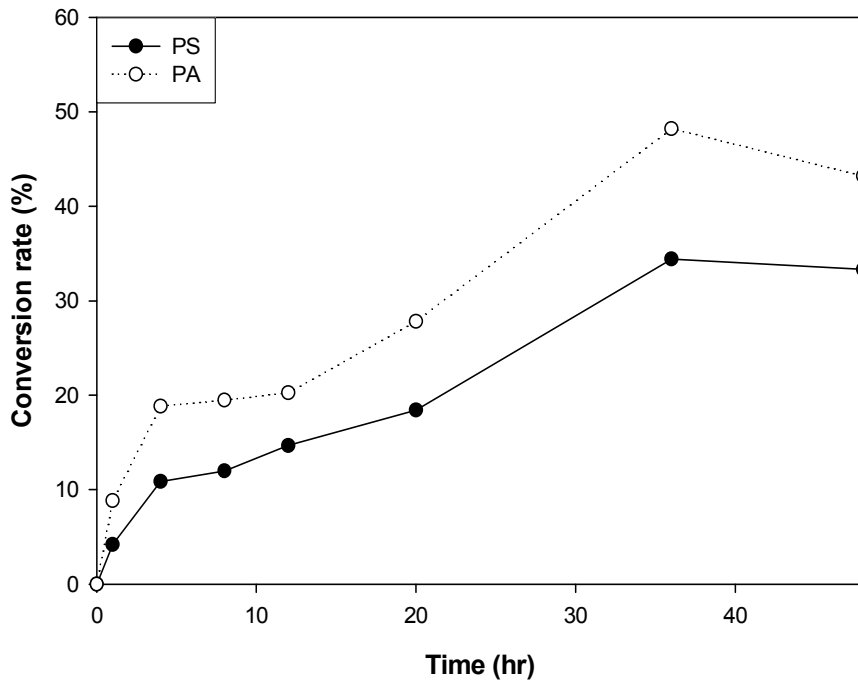


그림 54. 40mg 인지질의 PS생성에 대한 Time course

#### 나. 상업화 효소의 전이활성 비교

서로 다른 4종의 상업화된 PLD를 이용하여 포스파티딜기 전이반응을 수행하여 생성된 PS의 양을 비교한 결과는 표 18과 같다. *Streptomyces* sp.의 PS 생성율이 89.1%로 가장 좋았으며, 그 다음이 양배추로 25.6%의 PS가 생성되었다. 그리고 *Streptomyces chromofuscus* 유래의 PLD의 경우 PS는 생성되지 않았고, 77.2%의 PA만이 생성되었다.

표 18 상업화된 PLD 효소의 PS 생성율

효소원	생성된 PS (%)	생성된 PA (%)
Cabbage	25.6	60.1
<i>Streptomyces chromofuscus</i>	-	77.2
<i>Streptomyces</i> sp.	89.1	9.37
Peanut	11.5	60.3

#### 4. 결론

본 기술 개발 과정을 통하여 자사는 TLC 및 HPLC/ELSD를 통한 인지질의 분석법을 개발하였다. 더불어 랩 스케일의 실험을 통하여 기질의 종류, 반응온도, 흡착제의 종류 및 첨가량, 염과 수용체의 농도 등에 따른 포스파티딜기 전이반응(PS 생성반응)의 조건을 최적화하였다. 최적화된 조건에서 양배추 유래의 PLD를 이용하여 포스파티딜기 전이반응을 수행하여 40% 이상의 PS를 생산하였다. 또한 미생물 유래가 아닌 양배추 유래의 PLD를 본 실험에 적용함으로써 안전성이 확보된 식물유래 PLD를 포스파티딜기 전이반응에 사용할 수 있는 가능성을 제시하였다.



## 제5절 PS 생산 - 국산배추 PLD를 이용한 PS 생산

### 1. 서론

이미 많은 연구들로부터 두뇌활동 및 치매예방 등의 다양한 기능이 알려져 있으나, 자연계로부터 대량 분리정제가 어려운 포스파티딜세린(phosphatidylserine, PS)은 보편적으로 간단하면서 저렴하다고 알려진 대두 혹은 난황으로부터 얻은 레시틴을 기질로 하는 효소를 이용한 생산방식을 선호하고 있다. 그러나 PS 생성에 관한 지금까지의 연구에서는 기질에 포함된 지질의 불용성으로 인해 유기용매가 포함된 이상계 시스템이나 식품에서 문제가 될 수 있는 계면활성제를 포함한 시스템 상에서의 반응이 대부분이었다.

이에 앞선 연구에서 상업화된 PLD 효소 중 반응성이 좋으면서 안전한 식물유래인 양배추 PLD를 통하여 PS 생성의 조건을 탐색하였으며, 특히 식품 및 의약품으로서 문제가 될 수 있는 계면활성제 및 유기용매가 첨가되지 않은 수계 시스템 상에서의 반응을 이끌어 내었다. 따라서 이를 통하여 3차년도에 본사에서 다량 추출한 양배추와 같은 과에 속하는 국산 배추를 이용한 PLD를 이용해서도 보다 안전하고 PS 반응효율이 높은 조건을 찾아 보는 것과 동시에 양배추 PLD와의 차이에 대해 살펴보도록 한다.

### 2. 실험재료 및 방법

#### 가. 실험재료

실험에 사용된 효소는 앞서 본사에서 국산배추를 이용하여 추출한 PLD를 사용하였다. 기질로는 인지질 함량 90%인 GL-90E(난황 인지질, (주)고센바이오텍), 인지질 함량 70%인 GL-70E(난황 인지질, (주)고센바이오텍)이 기질로 사용되었으며, GL-90E와 GL-70E의 인지질 조성은 표 1과 같다.

L-Serine은 독일 Degussa로부터 구입하였으며, 포스파티딜에탄올아민(phosphatidylethanolamine, PE), 포스파티딜세린(phosphatidylserine, PS), 포스파티딕산(phosphatidic acid, PA), 스프링고마이엘린(sphingomyeline, SM), 라이소포스파티딜콜린(Lyso-phosphatidylcholine, LPC) 등의 인지질 표준물질은 Avanti사의 것을 사용하였다. Sodium acetate trihydrate, CaCl<sub>2</sub>, CaSO<sub>4</sub>는 Sigma사의 것을 사용하였다. 흡착제로 사용한 silica gel은 Merck사의 70~230mesh를, 다공질 유리는 (주)세라피아로부터 구입하였으며, 계면활성제는 남영상사와 SAMCHUN으로부터

터 구입하였다. 전이반응 후 인지질 추출 및 HPLC 분석에 사용된 용매는 chloroform, methanol 등으로 HPLC급을 사용하였다.

## 나. 실험방법

### (1) PS 생산을 위한 조건 탐색

본사에서는 다양한 녹황색식물 중 실험을 통하여 추출된 효소의 활성이 가장 높았으며, 이미 널리 사용되고 있는 양배추와 같은 과에 속하는 식물인 국산 배추로부터 PLD를 추출하였으며, 앞서 상업화된 양배추 PLD를 이용한 PS 생산 실험을 통하여 이에 관여하는 다양한 인자와 조건을 살펴보았다. 따라서 이를 토대로 본사에서 추출한 국산 배추 유래의 PLD를 이용한 PS 생성반응의 최적 조건을 알아보았다.

이 때 관여하는 주요 인자로는 기질의 종류 및 함량, pH, 반응시간, 반응온도, 흡착제, 계면활성제등이 있으며, 이러한 조건들을 통하여 PS 생성물이 가장 높은 반응을 이끌어 내기 위해 다음의 실험을 진행하였다.

기질인 GL-90E(난황 인지질, (주)고센바이오텍) 100mg을 L-serine과 CaCl<sub>2</sub>를 포함하는 50mM Sodium acetate buffer(pH 5.6)에 녹여 15분간 Sonication하여 기질용액으로 사용하였다. 효소는 본사에서 국산 배추로부터 직접 추출한 것을 사용하였으며, 반응 시간을 20시간으로 하여 기질의 종류 및 농도, 반응온도, pH, 흡착제, 교반방법, 계면활성제 등의 조건을 여러 가지로 변화시켰다. HPLC로 분석하기 위한 전처리는 양배추 PLD를 이용한 PS생산과 동일하게 수행하였다.

표 19 GL-90E와 GL-70E의 인지질 조성

Product	PC(%)	PE(%)	PS(%)	PA(%)	PI(%)	SM(%)	LPC(%)
GL-90E	76.50	10.35	0.81	-	-	1.53	1.35
GL-70E	63.30	5.99	0.21			0.47	-

## 다. 분석방법

### (1) HPLC/ELSD에 의한 인지질 분석

기질로 사용되는 인지질의 조성 및 PLD 효소와의 반응 후 변화된 인지질의 조성을 분석하기 위해 ELSD 검출기가 장착된 액체크로마토그래프를 사용하였다. 분석용 column으로는 Alltima HP silica column (10cm length, 4.6mm ID, 3µm particle size)을 사용하였다. 시료의 분리를 위한 용매와 분석조건 및 인지질 표준물질 크로마토그램은 표 2와 그림 1에 나타내었다.

## (2) TLC에 의한 인지질 분석

분석하고자 하는 인지질을 클로로포름에 4mg/ml이 되도록 용해시킨 뒤 샘플을 실리카겔 TLC판에 올린 후 Chloroform: Methanol: Ammonium hydroxide (65: 25: 4, v/v/v)를 전개용매로 하여 10cm 전개시킨다. TLC판을 건조시킨 뒤 요오드 증기를 이용하여 발색시킨 다음 표준시약과 비교하여 동정한다.

## 3. 실험결과 및 고찰

### 가. 국산배추 PLD를 이용한 PS 생산의 조건 탐색

#### (1) 기질의 영향

양배추 PLD를 이용한 실험에서 PC의 함량이 높은 기질의 사용이 PS로의 전환율을 높일 수 있음을 확인하였으나, 경제적 측면을 고려하여 본사에서 생산하는 GL-90E와 GL-70E(난황 인지질, (주)고센바이오택)을 이용하여 생성된 PS의 양을 비교하였다. 이 때 기질의 인지질 조성은 표1과 같았다. 그 결과 전환된 PA의 양은 유사하였으나, PS 전환율에서는 GL-90E가 높게 나타났으며, 샘플간의 PC함량 차이를 고려하더라도 GL-70E에 비해 PS 전환율이 훨씬 높은 것으로 나타났다(표 20). 따라서 본사의 GL-90E로부터 PS를 생산하는 것이 가장 적합할 것으로 사료된다.

또한 반응시의 기질의 함량에 따른 차이를 알아보는 실험에서는 기질의 함량이 100mg인 샘플에서 가장 높은 PS전환율을 나타냈었으며(표 21), 이는 기질의 함량이 높아질수록 pH를 비롯한 다양한 인자에 영향을 줄 수 있기 때문으로 생각된다.

표 20 기질의 종류에 따른 PS 생성률

Substrate	Converted PS (%)	Converted PA (%)
GL-90E (acetone precipitate)	45.37	36.29
GL-70E (acetone precipitate)	27.70	37.39

표 21 기질의 함량에 따른 PS 전환율

Contents	Converted PS (%)	Converted PA (%)
10mg	35.3	64.7
100mg	48.9	51.1
200mg	41.1	51.4
400mg	30.7	53.9

(2) 계면활성제에 따른 영향

계면활성제를 첨가한 양배추 PLD를 이용한 PS 생성 반응으로부터 계면활성제의 첨가가 기질의 용해성을 증가시켜 PS의 전환율이 높아진다는 결과를 얻었다. 이를 통하여 배추 PLD에서의 효과를 검증하기 위해 다양한 계면활성제를 첨가하여 반응을 실시하였다. 사용한 계면활성제는 식품에 가장 일반적으로 쓰이는 트윈 시리즈, 자당지방산에스테르(Sucrose Esters of Fatty Acids) 계열이었다. 그 결과 계면활성제를 첨가하지 않은 반응에서 얻은 PS 생성률을 기준으로 했을 때 계면활성제 첨가 반응이 오히려 PS 전환률이 떨어져 상업화된 양배추 PLD의 실험결과와는 상이한 결과를 나타내었다 (표22).

표 22 계면활성제 사용에 따른 PS 전환율

surfactant	Relative activity	Relative activity
	(transphosphatidylation)	(hydrolyzation)
No surfactant	100	100
S-170	39.2	45.9
S-1670	53.4	57.9
OWA-1570	64.6	75.7
Tween 20	57.7	71.8
Tween 80	59.5	69.8

### (3) 온도의 영향

국산배추로부터 추출한 PLD를 이용하여 반응 온도에 따라 20시간동안 포스파티딜기 전이반응을 수행하여 생성된 PS의 양을 비교하였다. 반응 온도가 높아질수록 기질인 PC의 함량은 줄어드는 반면 PS와 PA의 생성량이 증가하였으며, 특히 60℃에서 반응했을 경우 PS 생성률이 34.07%로 가장 높았다(그림 55). 가장 높은 PS 생성율을 보이는 60℃의 온도 조건에서 48시간을 반응시켜 54%의 PS가 생성됨을 확인하였다. 이는 양배추 PLD를 사용하여 PS 생산 실험에서 50~60℃ 간의 PS생성률이 유사한 것과는 상이한 결과로 같은 식물유래의 PLD이나 효소적 특성이 다르기 때문일 것으로 사료된다. 그러나 60℃ 이상의 온도는 인지질이 변성, 분해의 우려가 높으며 효소 자체의 멸실의 우려도 있으므로 바람직하지 않을 것으로 본다.

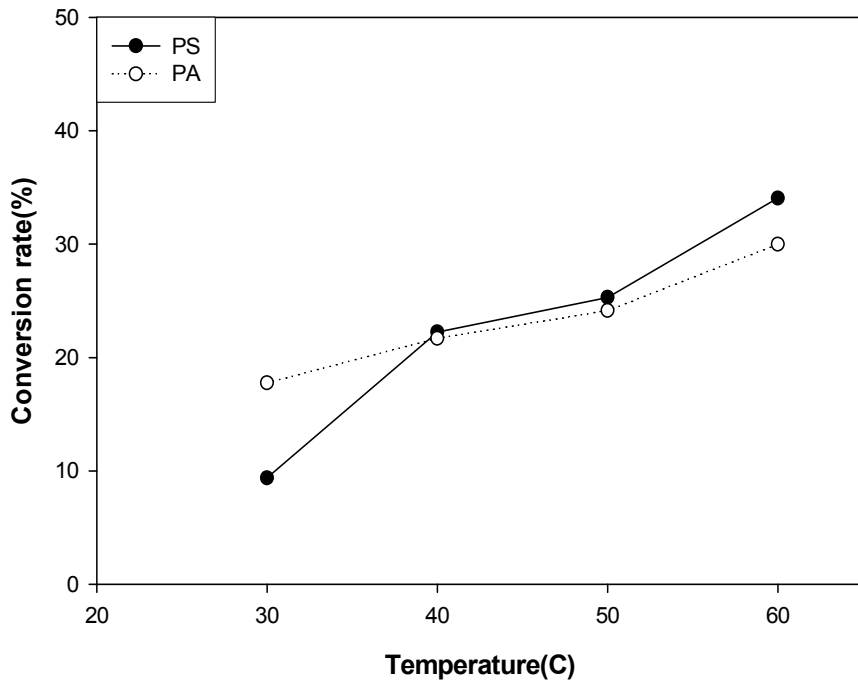


그림 55 반응온도에 따른 PS 전환율

#### (4) pH의 영향

pH의 차이에 따른 PS생성 반응에서는 약산성 구간인 pH 5.4 ~ 6.1에서 가장 높은 전환율을 나타내었다. 낮거나 높은 pH에서는 배추 PLD가 불활성화 될 우려가 있을 뿐만 아니라, 반응 기질과 생성물의 변질 우려가 있으며, 반응 시 다량 첨가되는 L-serine의 등전점이 5.68인 것을 감안할 때 반응조건의 pH는 5.6~5.7 정도가 유리 할 것이라고 사료된다. (그림 56)

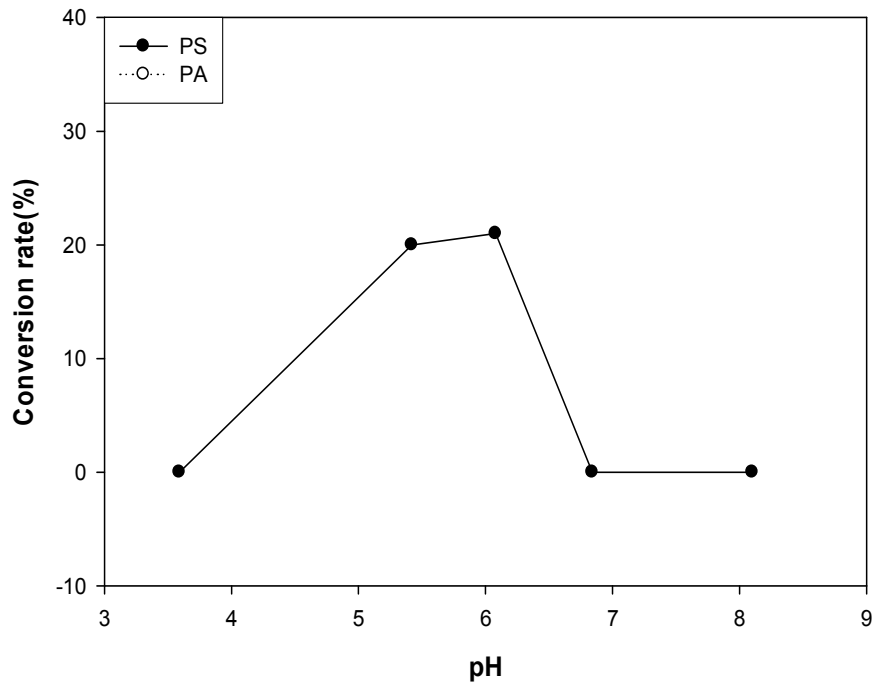


그림 56 pH에 따른 PS 전환율

(5) 반응시간에 따른 영향

국산배추 유래의 PLD를 이용하여 반응 시간에 따라 생성된 PS의 양을 비교하였다. 그림 1과 같이 반응을 시작한지 8~24시간까지 급격한 PS전환율을 보였으며, 반응시간 40시간에서 가장 높은 PS가 생성되었다. 40시간 이후 PS생성률은 차이를 보이지 않으며, 56시간 이후에는 PA의 전환율이 떨어지는 것을 확인하였다. 따라서 기질 100mg의로부터 최대의 PS를 생산하기 위해서는 약 40시간의 반응시간을 필요로 함을 확인하였다.(그림 57)

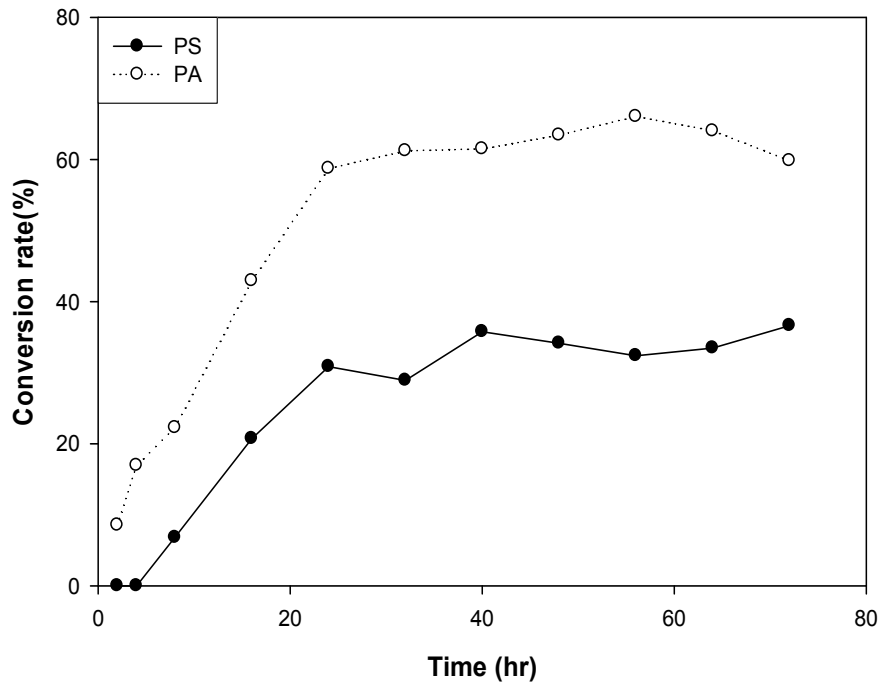


그림 57 반응시간에 따른 PS 전환율

#### 4. 결론

위의 실험을 통하여 PS 생성반응의 조건을 최적화하였으며, 기질로는 PC 함량이 높은 기질인 GL-90E가 적합하다고 사료되며, 온도는 50℃, pH 5.6의 조건에서 40시간 반응하는 것이 적절하다. 이때 액상의 PLD 효소를 사용할 경우 흡착제로써 Silica gel을 반응 시스템의 15 중량%를 첨가하는 것이 바람직하다. 이렇게 최적화한 조건하에서 평균 45% 이상의 PS와 50% 정도의 PA가 생성됨을 확인하였다.

그러나 60℃의 반응 조건에서 생성된 PS 함량이 54%로 가장 함량이 높았으나 기질 및 PLD의 안정성을 고려하여 50℃를 최적 온도로 설정하였다. 이러한 부분이 효소반응의 스케일업을 고려하였을 때 효소의 재사용율과 반응물의 변성을 최소화하면서 전체의 효율을 극대화 할 수 있는 조건이라 사료된다.

최적화된 조건에서 생성된 45%의 PS는 정제 실험을 통하여 60% 이상으로 용이하게 농축될 수 있다.



## 제 6 절 PS 정제 - 인지질 혼합물로부터의 PS 정제

### 1. 서론

- 인지질의 포스파티딜기 전이반응 후 얻어진 인지질 중, 포스파티딜세린을 함유하는 인지질 혼합물로부터 포스파티딜세린을 정제하는 처리방법으로서, 포스파티딜세린을 함유하는 인지질 혼합물을 알콜류에 용해한 후, 그 용해액중에 금속염을 첨가함으로써 포스파티딜세린을 불용화시키고, 그 불용부를 분리함으로써 포스파티딜세린을 간편하게 농축할 수 있다.

(금속염은 분말인채로 첨가해도, 물이나 알콜 등의 용매에 녹이고나서 첨가해도 좋다.)10~30℃에서 30분 이상 유지해서 PS를 불용화시킨다.)

이에 사용할 수 있는 금속염으로는 염화 리튬, 염화나트륨 또는 염화칼륨이 있으며 본 실험에서는 염화나트륨을 사용하였다(Sakaimasashi, 2003).

또한 물과 에틸아세테이트 및 에탄올을 사용하여 인지질 혼합물 중 포스파티딜세린의 농도를 높이는 것이 가능한지의 여부를 확인하였다.

### 2. 실험재료 및 방법

#### 가. 실험재료

실험에 사용된 효소는 앞서 본사에서 국산배추를 이용하여 추출한 PLD(1000U/ml)이며, 인지질 함량 90%인 GL-90E(난황 인지질, (주)고센 바이오텍)를 기질로 사용하였다. 50mM Sodium acetate buffer solution (pH 5.6, 100mM CaCl<sub>2</sub> 포함)을 수용체인 L-serine을 40%(w/w) 농도로 용해시켜 효소반응에 사용하였다. 3L fermentor를 반응 용기로 사용하였으며 흡착제로 Merck사의 70~230mesh Silica gel을 사용하였다.

포스파티딜세린의 농축에 5M NaCl solution을 제조하여 사용하였으며, Ethyl acetate 및 ethanol은 HPLC 급을 사용하였다.

#### 나. 포스파티딜세린의 제조

- 인지질 함량 90%의 난황 레시틴 20g과 40%의 L-serine을 용해시킨 Sodium acetate buffer solution(pH 5.6) 1kg을 반응기에 넣고 50℃에서 500rpm으로 한 시간 동안 교반한 후 균질기 20,000rpm으로 3분간 균질화한다.

PLD 수용액 (1,000U/ml)을 20ml 과 Silica gel 160g을 첨가함으로써 PLD 효소의 포스파티딜기 교환반응을 개시하였으며, 40시간동안 50℃에서 500rpm으로 교반하였다. 반응이 끝난 즉시 여과하여 Silica gel을 제거한 후 95% 에탄올(fermented ethyl alcohol)을 이용하여 지질을 추출한 후 추출물을 감압농축하여 용매를 증발시킨 후 추가 정제에 사용하였다.

#### 다. NaCl을 이용한 PS의 농축

반응생성물 1g에 에탄올 15ml을 첨가해서 50℃로 가온하여 녹인 후 5M NaCl solution 200ul 를 첨가하여 50℃로 가온하며 진탕하고, 상온에 1시간동안 방치하여 침전을 유도한다. 다음으로 5분간 원심분리하며 침전층과 상층을 수득하여 농축하고 상하층 샘플을 모두 HPLC 로 분석하여 인지질 조성을 확인하였다.

#### 라. 2-phase aqueous extraction을 이용한 PS의 농축

증류수 5ml, 에틸아세테이트 5ml, 반응생성물 100mg을 강하게 진탕한 후 실온에 방치하여 층 분리를 유도하고, 물층과 용매층을 분리하여 인지질의 조성을 분석한다.

또한 동일한 양의 증류수와 에틸아세테이트에 1, 2ml(용매 대비 10, 20%)에 해당하는 양의 에탄올을 각각 첨가한 후 반응생성물 100mg을 강하게 진탕한 후 실온에 방치하여 층 분리를 유도하고, 물층과 용매층을 분리하여 인지질의 조성을 분석한다.

### 3. 실험결과

#### 가. 포스파티딜세린의 제조

본 연구에서 배추로부터 추출하여 얻은 PLD 효소를 사용하여 인지질의 포스파티딜기 전이반응을 수행하여 얻은 반응 생성물의 PS 함량은 45%, PA 함량은 48%를 각각 나타내었다.

#### 나. NaCl을 이용한 포스파티딜세린의 농축

NaCl solution을 사용하여 반응생성물의 침전을 유도한 경우 상층부 즉, 에탄올층에 녹아있는 인지질에는 소량의 PS와 PA, 다량의 PC가 존재하며, 침전물에는 PS와 PA가 농축되었음을 확인할 수 있었다(표 23).

표 23 NaCl을 이용한 포스파티딜세린의 농축

Sample	Converted PS(%)	Converted PA(%)
Before purification	45.3	38.0
Supernatant	12.1	21.0
Precipitate	63.3	30.7

다. 용매추출을 이용한 포스파티딜세린의 농축

물과 에틸아세테이트에 에탄올을 첨가할 경우 인지질에 대한 분배계수가 변하므로 인지질 조성의 변화를 기대할 수 있으나 30% 이상의 에탄올을 첨가할 경우 세 용매가 섞여 층 분리를 유도할 수 없으므로 20%이하의 에탄올을 첨가한 경우에 한해 인지질을 녹여 층 분리를 유도했으며 결과는 표 24 와 같다. 상층(에틸아세테이트)에 존재하는 인지질은 대부분 PC인 것으로 확인되었으며, 중성지질 또한 존재함을 알 수 있었다. 에탄올을 첨가하지 않거나 20%의 에탄올을 첨가한 경우 물과 에틸아세테이트의 경계면에 인지질이 존재함을 확인하였으며, 10%인 경우에만 경계면에 인지질이 존재하지 않고 물 층과 에틸아세테이트 층으로 잘 분리되었음을 확인하였다 (표 24).

표 24 용매 추출법을 이용한 포스파티딜세린의 농축

Ethanol(%)	Phase	Converted PS(%)	Converted PA(%)
Before purification	-	45.3	38.0
No Ethanol	Ethyl acetate	-	-
	Water	46.2	44.5
	interfacial phase	11.6	22.2
10%	Ethyl acetate	-	-
	Water	49.9	40.5
20%	Ethyl acetate	0.6	-
	Water	38.5	50.3
	interfacial phase	49.0	44.7

에틸아세테이트는 대표적인 중간 정도의 극성을 가진 유기용매로써 비극성 용매와 극성 용매의 중간자적 성질을 유도한다. 본 aqueous extraction method 에서는 에탄올을 이용하여 ethyl acetate 와 water 의 miscibility 를 유도하면서 인지질 중 일부 성분을 ethyl acetate 로 이행하도록 시도하였다.

에탄올이 첨가되지 않은 군에서는 ethyl acetate 층에서 중성지질 만이 관찰되었다. 반면 에탄올의 함량이 증가하자 인지질이 ethyl acetate 층으로 이행하였으며, 특징적으로는 PC 성분이 다량 이동하여 상대적인 선택성을 보였다는 것이다. 이 같은 사실은 본 연구팀의 최초 예상과는 다소 어긋나는 것으로 극성의 차이가 많이 나는 PA 와 PS의 분리를 유도하였으나, PC 가 상대적으로 분리되는 결과를 낳았다.

결과적으로 초기 45% 가량의 PS순도를 보이는 반응물을 분리, 농축하여 50% 가까이 분리할 수 있었으나 염침전 법에 비해 낮은 순도를 보여 효과적인 분리법으로 확립하기 위해서는 추가적인 실험이 요구된다고 사료된다.

#### 4. 결론

NaCl solution을 사용하여 에탄올에 녹아있는 PS를 불용화시킴으로써 인지질 내 PS 함량을 40% 가량 향상시켜서 최종적으로는 63% 의 PS를 수득할 수 있었다. 이 때 PS의 회수율은 70% 수준이었으며, 침전의 유도과 회수가 용이하여 스케일업 공정으로의 적용성이 우수한 특성을 보여주었다. 반면 물과 에틸아세테이트를 사용하여 인지질 반응생성물을 녹일 경우 에틸아세테이트 층으로 중성지질 및 반응에 참여하지 못한 기질인 PC를 추출할 수 있어 다른 인지질과 분리할 수 있으며, 이는 순도를 높이는 데 기여할 수 있었지만 PS의 순도를 높이기 위한 목적에는 부합하지 못하는 것으로 나타났다.

즉, 리터(L) 스케일로 반응하여 얻은 45% 의 PS를 추가적인 염침전법을 활용, 60% 이상(63%)의 순도를 보이는 PS를 얻었다. 본 정제법은 추가적인 탄화수소 계열의 유기용매를 이용하지 않고 non-toxic 한 환경에서 재현이 가능하여 식품 및 건강기능식품 생산 공정에 적용할 수 있는 기반을 마련하였다.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

본 연구과제를 통해 연구팀은 점차로 기능성과 특이적 구조변환을 통한 Designer phospholipids 가 요구되는 시장 환경에 적합한 제품을 개발할 수 있는 발판을 마련할 수 있었다.

고도불포화지방산이 강화된 인지질은 현재 주관연구기관인 (주)고센바이오텍에서 활용 및 판매하고 있는 제품의 일부 품목이며 현재 10% 정도의 선에서 머무는 함량을 증강시킴으로 해서 제품의 기능성 및 부가가치를 증대할 수 있을 것으로 예상된다. PS(포스파티딜세린)의 경우 최근 기능성 식품의 산업 확대에 발 맞추어 새로운 제형, 기능성을 가진 신제품을 출시할 수 있다.

더불어 관련 제품 개발에 있어 필수적인 효소의 추출, 정제, 분석, 고정화 등에 수반된 일련의 기술 들을 습득하고 개발할 수 있었다. 이는 지질(lipids) 관련 변환 및 정제 기술에 기여할 수 있을 것으로 기대 되며, 특히 인지질과 관련하여 현재 90% 이상 수입에 의존하고 있는 상황에서 수입 대체 효과와 함께 국내 기술진에 의한 기술 개발로 인해 국내 식품 기술 향상에 기여할 것으로 기대한다.

PS의 합성에 수반되는 PLD는 대부분 미생물(방선균)에서 유래한 것으로, 본 연구팀은 미생물 정제과정에서 식품에 잔존하여 문제를 발생시킬 수 있는 독소의 우려사항을 없앨 수 있는 안전한 생산법을 개발 하였다. 이는 국내 농수산물 중 특히 배추의 소비를 촉진시킬 수 있다. 본 효소 추출에는 최상급의 배추뿐만 아니라, 식용으로 가능한 대부분의 채소를 사용할 수 있으므로 부산물 활용이라는 측면에서 식품산업의 발전에 기여하는 바가 있다고 하겠다.

## 제 1 절 연구개발의 목표 및 평가의 착안점

구분	연도	세부연구목표	가중치	평가의 착안점 및 기준
1차 년도	2006	인지질 지방산 에스테르 치환 반응	40%	HPLC, GC를 이용한 전환율 분석 및 측정
		상용 효소를 이용한 포스파티딜기 전이 반응 실험	30%	HPLC 분석을 통한 전환율
		효소 추출 방법 확립	30%	추출 수율 및 활성도
2차 년도	2007	고순도 효소 정제 방법 확립	25%	정제효소의 단위 당 순도 측정, 정제 효율
		효소 고정화 조건 확립	25%	고정화 효소 반응 안정성
		인지질 에스테르 치환 반응 최적화	30%	반응 수율, 전환율 및 반응 조건 확립 여부
		포스파티딜기 전이 반응 조건 최적화	20%	반응수율, 전환율, 효소활성도 및 반응 안정성 분석
3차 년도	2008	고정화 효소 안정성 확립	15%	효소 life span, 활성도
		효소의 상업적 생산 프로세스 개발	35%	추출, 정제, 고정화 프로세스 조건 최적화 정도
		반응 공정 파일럿 프로세스 개발/최적화	50%	스케일업 반응 조건에서의 수율, 활성도 분석
최종 평가		효소 정제 및 고정화 안정	35%	효소 활성 및 life span, 단위당 반응 효율
		프로세스 최적화	30%	반응의 재현성(안정성) 및 경제적 반응 조건 확립 여부
		최종 반응 생산물 최적화	35%	HPLC, NMR, GC등을 이용한 최종 생산물의 분석 및 최적화

## 제 2 절 연구개발 수행내용 및 목표달성도

가. 세부과제명 : 효소를 이용한 지방산 에스테르치환 및 포스파티딜기 전이 반응

최종목표	연구개발 수행내용	달 성 도(%)
효소 치환반응을 통해, 고도불포화지방산이 30% 이상인 기능성 인지질의 제조	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 기능성 인지질 개발을 위해 고도불포화지방산 함량을 향상시키기 위한 치환반응 연구</li> <li>● 효소 탐색(Lipase,PLA)</li> <li>● 최적 반응조건 탐색 및 공정 조건 탐색</li> <li>● Q/C 용 분석법 개발</li> </ul>	100%
식물유래 PLD효소를 이용하여 60% 이상 순도의 PS 생산법 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 식물유래 PLD를 이용한 PS의 제조법 개발</li> <li>● PS 반응물로부터 효과적인 PS 정제법 개발</li> <li>● Q/C 용 PS 및 인지질 혼합물 분석법 개발</li> </ul>	100%

나. 위탁과제명 : 효소의 분리와 정제 및 반응물 분석

최종목표	연구개발 수행내용	달 성 도(%)
국내산 식물농산물로부터 상업용 PLD 효소의 제조법 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 국내산 농산물 스크리닝을 통해 최적의 PLD 추출 후보물질 선정</li> <li>● 상업화 가능한 효소 추출/정제법 개발</li> <li>● 효소 고정화 방법 개발</li> <li>● 효소 활성도 및 수율 측정을 위한 검사법 개발</li> </ul>	100%



## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 제 1 절 실용화 및 산업화 계획

#### 1. PL-PUFA 생산

##### 가. 현재 기술

현재 500 mL 규모에서 20시간 이상에서 30% 정도로 전환이 가능함이 확인되었다.

##### 나. 추가 기술

수십 L 단위의 고정화반응기의 개발과, scale-up에서 수율과 안정성, 경제성의 확보가 유지되는지 확인이 필요하다.

##### 다. 향후 계획

2년 안에 생산이 가능 할 것이다. 기능성 원료와 첨가물 모두 가능하다.

#### 2. PS 생산

##### 가. 현재 기술

현재 1,000 mL 규모에서 20시간 이상에서 20 ~ 60 % 정도로 전환이 가능함이 확인되었다.

##### 나. 추가 기술

수십 L 단위의 고정화 반응기의 개발과, scale-up에서 수율과 안정성, 경제성의 확보가 유지되는지 확인이 필요하다.

##### 다. 향후 계획

개별 인증을 진행할 예정이고, 기능성 원료와 첨가물 모두 가능하다.  
3 년 안에 생산이 가능 할 것이다.

#### 3. PLD 효소 자체 소요량 생산

##### 가. 현재 기술

현재 수십 L 규모에서 생산이 가능함이 확인되었다.

##### 나. 추가 기술

증산을 위한 UF 카트리지가 같은 추가 장비 만 갖추면 된다.

#### 다. 향후 계획

PS 생산에 맞추어 생산할 것이다.

### 제 2 절 기술 확산 계획

#### 1. 논문 게재

포스포리파아제 D : 배추로부터 산업적 분리 공정과 난황레시틴 용액 중의 효소 특성 {Phospholipase D : Industrial Isolation Process from Chinese Cabbage and Enzymatic Characteristics in Egg Lecithin Solution}

#### 2. 논문 게재

포스파티딜세린 합성 특성 : 양배추 포스포리파아제 D에 의한 난황 레시틴의 염기전이반응 특성

#### 3. 논문 게재

포스파티딜세린 합성 공정 : 배추 포스포리파아제 D에 의한 난황레시틴의 염기전이반응 공정

#### 4. 논문 게재

포스포리파아제의 고정화 방법 : 포스포리파아제 A (PLA) 와 포스포리파아제 D (PLD) 의 고정화 방법에 따른 고정화 효소 특성

### 제3절 지적 재산권 확보 계획

#### 1. 특허 출원 {심사 중}

배추 포스포리파아제 D의 대량 생산 방법  
출원번호 : 10-2009-0028860

#### 2. 특허 출원 {심사 중}

배추 포스포리파아제 D의 크로마토그래피 정제 방법

출원번호 : 10-2009-0028861

3. 특허 출원 {출원 준비 중}

양배추 포스포리파아제 D에 의한 난황 레시틴의 포스파티딜세린 합성 방법

출원번호 : 10-2009-

4. 특허 출원 {출원 준비 중}

배추 포스포리파아제 D에 의한 난황 레시틴의 포스파티딜세린 합성 방법

출원번호 : 10-2009-

5. 특허 출원 {출원 검토 중}

포스포리파아제의 고정화 방법 : 포스포리파아제 A (PLA) 와 포스포리파아제 D (PLD) 의 고정화 방법에 따른 고정화 효소 특성

출원번호 : 10-2009-

## 제4절 추가 연구 및 타 연구 활용 계획

1. PL-PUFA 제품 안정성 연구
2. PS 제품 안정성 연구
3. PLD 효소 정제 수율, 순도 및 안정성 연구

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

## 제 7 장 참고문헌

Chan, L.W., Lee, H.Y., & Heng, P.W.S. (2002). Production of alginate microspheres by internal gelation using an emulsification method. *Int. J. Pharm.* **242**, 259–262

Dittrich, N., & Ulbrich–Hofmann, R.(2001). Transphosphatidylation by immobilized phospholipase D in aqueous media. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **34**, 189–194

Ferreira Almeida, P., & Almeida, A.J. (2004). Cross–linked alginate–gelatine beads: a new matrix for controlled release of pindolol. *J. Control. Release* **97**, 431–439

Gupta, Munishwar N., Shweta Sharma, and Ipsita Roy, (2001), Separation of Phospholipase D from Peanut on a Fluidized Bed of Crosslinked Alginate Beads, *Biochem. Bioeng. J.*, **8**, 235–239

Gupta, Munishwar N., and Shweta Sharma, (2001), Purification of Phospholipase D from *Dacus carota* by Three–Phase Partitioning and Its Characterization, *Protein Exp. Purif.*, **21**, 310–316

Gupta, Munishwar N., and S. Teotia, (2004), Purification of Phospholipase D by Two–Phase Affinity Extraction, *J. Chroma.*, **1025**, 297–301

Gurantz, D., Laker, M.F., & Hofmann, A.F. (1981), Enzymatic measurement of choline–containing phospholipids in bile. *J. Lipid Res.* **22**, 373–376

Hosokawa, M., Shimatani, T., Kanada, T., Inoue, Y. & Takahashi, K. (2000). Conversion to docosahexaenoic acid–containing phosphatidylserine from squid skin lecithin by phospholipase D–mediated transphosphatidylation. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 4550–4554

<http://www.brassica-resource.org/>(2006), Korea Brassica Genome Resource Bank;

Iwasaki, Y., Mizumoto, Y., Okada, T., Yamamoto, T., Tsutsumi, K., & Yamane, T. (2003). An aqueous suspension system for phospholipase D-mediated synthesis of PS without toxic organic solvent. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **80**, 653–657

Jung, Joon-Ki, Jung-Soo Seo, Moo-Sang Kim, Na-Young Kim, Sang-Jung Ahn, Bo-Young Jee, Sung-Hee Jung, Jin-Woo Kim, Ki-Dong Kim, and Hyung-Ho Lee, (2008), Characterization of Phosphatidylcholine-Hydrolyzing Phospholipase D in the Scuticociliate Parasite, *Uronema marinum*, *J. Fish. Pathol.*, **21**(1), 1–11

Kater, Laurence A., Edward J. Goetzi, and K. Frank Austen, (1976), Isolation of Human Eosinophil Phospholipase D, *J. Clin. Invest.*, **57**(5), 1173–1180

Koh, Eun-Hie, Hay-Young Lee, and Myung-Un Choi, (1989), Purification and Characterization of the Active Site of Phospholipase D, *Kor. Biochem. J.*, **22**(4), 487–493

Koh, Eun-Hie, and In-Sook Park, (1996), Reactivity of Phospholipase D toward Phosphatidylcholines with Different Length of Acyl Chains, *J. Kor. Chem. Soc.*, **40**(9), 630–634

Koh, Eun-Hie, (2006), Characterization of Cystein Residues in Cabbage Phospholipase D by Sulfhydryl Group Modifying Chemicals, *J. Kor. Chem. Soc.*, **50**(5), 362–368

Leiros, Ingar, Sean Mc Sweeney and Edward Hough, (2004), The Reaction Mechanism of Phospholipase D from *Streptomyces* sp. Strain PMF. Snapshots along the Reaction pathway Reveal a Pentacoordinate Reaction Intermediate and Unexpected Final Product, *J. Mol. Biol.*, **339**(4), 805–820

Lim, Si-Kyu, Jae-Woong Choi, Eun-Tag Lee, Yong-Ho Kang, Sang-Dal Kim, and Doo-Hyun Nam, (2002), Isolation of *Streptomyces* sp. YU100 Producing Extracellular Phospholipase D, *J. Microbiol. Biotechnol.*, **12**(1), 71-76

Lim, Si-Kyu, Jae-Woong Choi, Min-Ho Chung, Eun-Tag Lee, Yong-Ho Kang, Sang-Dal Kim, and Doo-Hyun Nam, (2002), Production and Characterization of Phospholipase D from *Streptomyces* sp. YU100, *J. Microbiol. Biotechnol.*, **12**(2), 189-195

Luzzato, Kfir et al.,(2005) PCT, WO 2005/027822 A2

Manoharan, K., Chae, H.S., Cha, J.M., Cho, S.H., Shin, S.H., Cho, B.H., & Lee, W.S. (2000). Synthesis of phosphatidylserine in carrot cells cultured under carbon-source starvation. *Plant Cell Physiol.*, **41**, 1143-1148

Moon, M.W., Lee, J.K., Oh, T.K., & Shin, C.S. (2006). Gene cloning of streptomyces phospholipase D P821 suitable for synthesis of phosphatidylserine. *J. Microbiol. Biotechnol.*, **16**, 408-413

Morris, A.J., Frohman, M.A., & Engebrecht, J. (1997). Measurement of phospholipase D activity. *Anal. Biochem.*, **252**, 1-9

Mutua, L.N., & Akoh, C.C. (1993). Lipase-catalyzed modification of phospholipids: Incorporation of n-3 fatty acids into biosurfactants. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **70**, 125-128

Patton, G.M., Fasulo, J.M., & Robins. S.J. (1982). Separation of phospholipids and individual molecular species of phospholipids by high-performance liquid chromatography, *J. Lipid Res.*, **23**, 190-196

Paul, C., Edouard M.B., & Robert, F.A.Z. (1990). Enzymatic synthesis of phosphatidylserine on small scale by use of a one-phase system, *J. Lipid Res.*, **31**,1719-1721

Pisch, S., Bornscheuer, U.T., Meyer, H.H., & Schmid, R.D. (1997),

Properties of unusual phospholipids IV: Chmoenzymatic synthesis of phospholipids bearing acetylenic fatty acids, *Tetrahedron* **53**(43), 14627–14634

Rhee, Hae-Ik, Dong-Hun Park, Eui-Ho Jeong, and Sang-Young Lee, (1990), Characterization of Chinese Cabbage Phospholipase D by a Multistirring Batch System Bioreactor, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, **5**(2), 119–124

Rhee, Hae-Ik, Eui-Ho Jeong, and Sang-Young Lee, (1991), Biosynthesis of Unnatural Phospholipids by Phospholipase D: I. Synthesis in a Emulsion System, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, **6**(3), 271–279

Rhee, Hae-Ik, Eui-Ho Jeong, and Sang-Young Lee, (1991), Biosynthesis of Unnatural Phospholipids by Phospholipase D: II. Effect of Solvents on Transphosphatidylolation, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, **6**(3), 281–288

Rhee, H.I., Park, K.S., Choi, Y.S., and Lee, S.Y. (1991). Purification and characterization of peroxidase from chinese cabbage. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **19**, 470–476

Sajdok, J., Jandus, J., Valentova, O., Novotna, Z., Kas, J., & Daussant, J. (1995). A microplate technique for phospholipase D activity determination. *Anal. Chem. Acta* **315**, 109–112

Sakaimasashi, 2003, KR patent, 10–2003–7001560.

Dippe, M., Mrestani-Klaus, C., Schierhorn, A., & Ulbrich-Hofmann, R. (2008). Phospholipase D-catalyzed synthesis of new phospholipids with polar head groups. *Chemistry and Physics of Lipids*, **152**, 71–77

Sharma, S., Sharma, A., & Gupta, M.N. (2004). One step purification of peanut phospholipase D by precipitation with alginate. *Bioseparation* **9**, 93–98

Shin, Su-A, Shin-Young Park, Joo-Whan Cho, Joong-Soo Han, Jae-Won Oh, and Ha-Baik Lee, (2007), Detection of SNP of



Phospholipase D1 in Children with Atopic Dermatitis, *Pediatr. Allergy Respir. Dis. (Kor.)*, 17(3), 173–182

Son, Dong-Hwa, Bo-Yeon Kwak, Suk-Hoo Yoon, and Chang-Jin Kim, (2003), Purification and Characterization of Phospholipase D from *Actinomyces* KF923, *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.*, 31(4), 389–394

Son, Dong-Hwa, Bo-Yeon Kwak, Suk-Hoo Yoon, and Chang-Jin Kim, (2004), Purification and Characterization of Phospholipase D from *Actinomyces* KF923, *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.*, 32(1), 78–83

Tsai, T.H. (2000). Separation methods used in the determination of choline and acetylcholine. *J. Chromatogr.*, 747, 111–122

Virto, C., Svensson, I., & Adlercreutz, P. (2000). Hydrolytic and transphosphatidyltransferase activities of phospholipase D from savoy cabbage towards lysophosphatidylcholine. *Chemistry and Physics of Lipids*, 106, 41–51

Wang, Xuemin, and Kirk Pappan, (1999), Plant Phospholipase D $\alpha$  Is an Acidic Phospholipase Active at Near-Physiological Ca<sup>2+</sup> Concentrations, *Archiv. Biochem. Biophys.*, 368(2), 347–353