



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년10월02일
(11) 등록번호 10-1446475
(24) 등록일자 2014년09월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 7/64 (2006.01) C12P 9/00 (2006.01)
C12N 11/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0099146

(22) 출원일자 2013년08월21일

심사청구일자 2013년08월21일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020110034116 A

KR1020070122059 A

Enzyme and Microbiol Technolgy. 2007, Vol.40,
pp.1130-1135

(73) 특허권자

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암
동5가)

(72) 발명자

김인환

서울 노원구 공릉로58길 176, 102동 1108호 (하계
동, 우방아파트)

조정정

서울특별시 성북구 솔샘로1길 19 (정릉동) 407호
(뒷면에 계속)

(74) 대리인

한양특허법인

전체 청구항 수 : 총 5 항

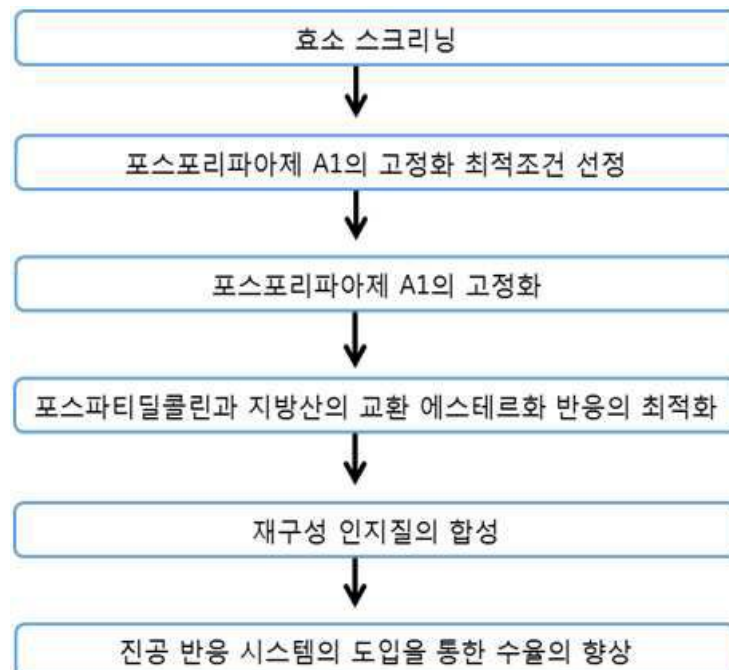
심사관 : 한지혜

(54) 발명의 명칭 재구성 인지질의 합성 방법

(57) 요약

본 발명은 효소적 방법을 이용하여 재구성 인지질을 합성하는 방법에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 인지질과 지방산의 교환 에스테르화 반응을 통하여 인지질에 결합된 지방산을 원하는 지방산으로 대체할 수 있는 매우 효과적인 방법이다. 본 발명에서는 재구성 인지질을 합성하기 위한 적합한 효소의 종류를 선택하고, 반응의 효율성을 높이기 위한 고정화 방법을 이용하였다. 효소를 이용한 교환 에스테르화 반응 및 진공 시스템을 이용한 재합성을 통하여 인지질 내의 원하는 지방산의 함량을 높일 수 있음을 확인하였다.

대표도 - 도1



(72) 발명자		노다솜
홍승인		서울 서초구 바우피로 91, 111동 1102호 (양재동, 우성아파트)
서울특별시 성북구 동선동5가 146-17 베스트빌 302호		
이 발명을 지원한 국가연구개발사업		
과제고유번호	111129032SB010	
부처명	농림수산식품기술기획평가원	
연구관리전문기관	보건과학대학학사지원부	
연구사업명	고부가식품산업전문인력양성사업	
연구과제명	기능성 인지질의 효소적 합성과 식품 소재화 연구	
기 여 율	1/1	
주관기관	고려대학교 산학협력단	
연구기간	2012.12.26 ~ 2013.12.25	

특허청구의 범위

청구항 1

- a) 인지질의 교환 에스테르화 반응을 위한 효소를 선택하는 단계;
- b) 상기 a) 단계에서 선택된 효소를 고정체를 이용하여 고정화시키는 단계;
- c) 상기 b) 단계에서 고정화시킨 효소의 고정화도 및 활성을 평가하는 단계;
- d) 인지질로 포스파티딜콜린(phosphatidyl choline) 및 지방산으로 도코사헥사에노산(Docosa Hexaenoic Acid:DHA)을 혼합하는 단계;
- e) 상기 d)단계에서 혼합된 인지질 및 지방산의 혼합물에 대하여 수분 함량을 0.2 내지 1.4%로 조절하는 단계;
- f) 상기 e)단계의 혼합물에 상기 b)단계에서 고정화시킨 효소를 혼합하여 반응 온도가 35 내지 65℃인 조건에서 반응시키는 단계; 및
- g) 상기 반응물에 진공 시스템을 0 내지 10 torr로 유지하면서, 칸디다 안타르크티카(*Candida Antarctica*) 유래 고정화효소를 추가로 첨가하여 반응시키는 단계를 포함하는 재구성 인지질의 합성 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 효소는 써모마이세스 라누기노서스(*Thermomyces lanuginosus*) 또는 푸사리움 옥시스포럼(*Fusarium oxysporum*)으로부터 유래된 포스포리파아제 A₁(phospholipase A₁)이고, 상기 인지질 및 지방산의 중량 대비 2.5 내지 20 중량%인 것을 특징으로 하는, 재구성 인지질의 합성 방법.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 b)단계에서 효소를 고정화시키기 위하여 사용되는 고정체는 Duolite A568, Amberlite XAD 7HP, Lewatit VP OC 1600, Accrurel MP 1000, Amberlite XAD4, Octyl silica로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 재구성 인지질의 합성 방법.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 b)단계에서 효소를 고정화시키기 위하여 사용되는 pH의 범위는 5.5 내지 8.5이고, 효소 용액의 농도는 고정체 중량을 기준으로 희석 비율이 30 내지 90%인 것을 특징으로 하는, 재구성 인지질의 합성 방법.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 인지질로 포스파티딜콜린(phosphatidyl choline) 및 지방산으로 도코사헥사에노산(Docosa Hexaenoic Acid:DHA)의 몰비율은 1:2 내지 1:8인 것을 특징으로 하는, 재구성 인지질의 합성 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 효소적 방법을 이용하여 재구성 인지질을 합성하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 인지질은 자연계에 존재하는 천연 유화제로서 인을 포함하는 복합지질이다. 인산기와 지방산을 가짐으로써 양친매성을 띠고 있으므로 계면활성제 및 유화제로서 활용이 가능하다. 인지질의 종류가 크게 포스파티딜콜린(phosphatidyl choline: 이하 PC), 포스파티딘산(phosphatidic acid:PA), 포스파티딜에탄올아민(phosphatidylethanolamine:PE), 포스파티딜세린(phosphatidylserine:PS)으로 4가지 종류가 있고, 생리적 기능성에서 약간의 차이를 보이나, 대체로 콜레스테롤 조절, 혈액 순환 개선 및 두뇌 영양 공급 등의 기능성을 갖는 것으로 알려져 있다.

- [0003] 식품으로부터 많이 구할 수 있으면서 널리 사용되는 가장 대표적인 인지질은 레시틴으로 주로 포스파티딜콜린으로 이루어진 물질이다. 이는 탈검 공정(Degumming)의 결과 얻어진 검질을 원료로 하여 정제한 것이다. 이전에는 레시틴은 계란의 난황으로부터 추출되었으므로 귀한 제품이었으나, 현재에는 대두에서도 대량 제조가 가능하기 때문에 저렴한 가격으로 광범위하게 사용되고 있다. 대두 레시틴은 식품에 사용해서 우수한 유화제 일뿐만 아니라 영양학적으로도 가치가 높다. 현재 대량으로 생산되는 레시틴은 대두에서 얻어지며, 그 외에 옥수수 등의 스크(scum)에도 인지질이 포함되어 있다.
- [0004] 이러한 기능성을 갖는 인지질이 유용한 지방산들과 결합하여 재구성 인지질을 합성함으로써 인지질의 생리적인 기능성을 향상시킬 뿐만 아니라 다양한 범위의 유화 능력을 갖는 인지질로 합성이 가능하다. 그 중에서도, 효소를 이용하여 합성하는 방법은 안전하고 친환경적인 방법이고, 효소를 이용한 반응은 화학적인 다른 방법들에 비하여 낮은 온도에서도 반응이 가능하며, 효소가 가지고 있는 특이성에 의하여 부산물의 생성이 적은 장점이 있다. 하지만 효소 자체로 사용할 경우에 경제적인 측면이나 효소 여과의 문제 등의 공정상에서도 효율적이지 않기 때문에 효소의 고정화 과정이 필수적으로 수반된다. 이에 따라, 효소를 고정화시키는 방법은 공유 결합, 이온 결합, 물리적 흡착, 캡슐 형성, 포괄법 등이 있으나 리파아제(lipase)의 고정화에 주로 사용되는 방법은 극성 고정체에 의한 이온 결합 방법과 비극성 고정체(다공성 폴리머)에 의한 흡착방법이 사용된다. 효소의 고정화는 고정체는 물론이고 고정화하는 방법에 의하여 효소의 활성이 크게 변화하게 된다.
- [0005] 이에, 본 발명자들은 포스포리파아제 A1을 고정화시키고 이를 이용하여, 인지질과 지방산을 교환 에스테르화 반응을 시켜 재구성 인지질을 합성하여, 에스테르화 반응 시 진공 시스템을 이용하여 원하는 지방산의 함량을 높은 재구성 인지질의 수율을 향상시킬 수 있음을 확인하였고, 본 발명을 완성하였다.
- [0006] 한편, 대한민국 공개특허 10-2011-0034116호에는 고정화 포스포리파아제 A2에 의한 인지질의 지방산 치환의 선택성과 생산성의 향상 방법에 관한 기술이 공개되어 있으나, 본 발명에서 사용하는 효소와 종류가 상이한 차이점이 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0007] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 10-2011-0034116호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명은 썬모마이세스 라누기노시스(*Thermomyces lanuginosus*) 또는 푸사리움 옥시스포럼(*Fusarium oxysporum*)으로부터 유래된 포스포리파아제 A1을 효소로 고정체를 이용하여 고정화시키고, 인지질로 포스파티딜콜린(phosphatidyl choline) 및 지방산으로 도코사헥사에노산(Docosa Hexaenoic Acid:DHA)을 기질로 사용하여 교환 에스테르화 반응을 통해 원하는 지방산의 함량을 높은 재구성 인지질을 합성하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0009] 상기 목적을 달성하기 위하여,
- [0010] 본 발명은 a) 인지질의 교환 에스테르화 반응을 위한 효소를 선택하는 단계;
- [0011] b) 상기 a) 단계에서 선택된 효소를 고정체를 이용하여 고정화시키는 단계;
- [0012] c) 상기 b) 단계에서 고정화시킨 효소의 고정화도 및 활성을 평가하는 단계;
- [0013] d) 인지질로 포스파티딜콜린(phosphatidyl choline) 및 지방산으로 도코사헥사에노산(Docosa Hexaenoic Acid:DHA)을 혼합하는 단계;
- [0014] e) 상기 d)단계에서 혼합된 인지질 및 지방산의 혼합물에 대하여 수분 함량을 0.2 내지 1.4%로 조절하는 단계;
- [0015] f) 상기 e)단계의 혼합물에 상기 b)단계에서 고정화시킨 효소를 혼합하여 반응 온도가 35 내지 65℃인 조건에서

반응시키는 단계; 및

[0016] g) 상기 반응물에 진공 시스템을 0 내지 10 torr로 유지하면서, 칸디다 안타르크티카(Candida Antarctica) 유래 고정화효소를 추가로 첨가하여 반응시키는 단계를 포함하는 재구성 인지질의 합성 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0017] 본 발명의 재구성 인지질의 합성 방법에 의하면, 인지질과 지방산을 이용한 교환 에스테르화 반응에 적합한 효소의 조건을 선택할 수 있고, 상기 효소의 반응성을 높일 수 있는 고정화 조건을 설정할 수 있다. 따라서, 용매 및 보조인자를 포함하지 않고도 효과적으로 원하는 지방산의 함량을 높인 재구성 인지질을 합성할 수 있는 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 재구성 인지질을 합성하는 전체 단계를 간략히 나타낸 개요도이다.
 도 2는 재구성 인지질 합성에 사용될 효소를 고정화시키는 방법을 간략하게 나타낸 개요도이다.
 도 3은 재구성 인지질을 합성에 사용될 효소 선정을 위한 실험 결과를 나타낸 그래프이다.
 도 4는 재구성 인지질을 합성하기 위한 효소 고정화에 사용될 고정체 선정을 위한 실험 결과를 나타낸 그래프이다.
 도 5는 재구성 인지질을 합성하기 위한 효소 고정화에 사용될 완충 용액의 pH 범위를 선정하기 위한 실험 결과를 나타낸 그래프이다.
 도 6은 재구성 인지질을 합성하기 위한 효소 고정화에 사용될 효소 희석 용액의 농도 선정을 위한 실험 결과를 나타낸 그래프이다.
 도 7은 재구성 인지질 합성 방법에서 초기 수분 함량에 따른 실험 결과를 나타낸 그래프이다.
 도 8은 재구성 인지질 합성 방법에서 반응 온도에 따른 실험 결과를 나타낸 그래프이다.
 도 9는 재구성 인지질 합성 방법에서 고정화 효소량에 따른 실험 결과를 나타낸 그래프이다.
 도 10은 재구성 인지질 합성 방법에서 진공 시스템을 이용할 경우의 실험 결과를 나타낸 그래프이다.
 도 11은 고정체로 Lewatit VP OC 1600를 이용할 경우의 고정화 효소량에 따른 재구성 인지질 합성 결과를 나타낸 그래프이다.
 도 12는 시간별 진공 도입 시점에 의한 재구성 인지질 재합성 효과를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 이하 본 발명을 구체적으로 설명한다.

[0020] 본 발명은,

[0021] a) 인지질의 교환 에스테르화 반응을 위한 효소를 선택하는 단계;

[0022] b) 상기 a) 단계에서 선택된 효소를 고정체를 이용하여 고정화시키는 단계;

[0023] c) 상기 b) 단계에서 고정화시킨 효소의 고정화도 및 활성을 평가하는 단계;

[0024] d) 인지질로 포스파티딜콜린(phosphatidyl choline) 및 지방산으로 도코사헥사에노산(Docosa Hexaenoic Acid:DHA)을 혼합하는 단계;

[0025] e) 상기 d)단계에서 혼합된 인지질 및 지방산의 혼합물에 대하여 수분 함량을 0.2 내지 1.4%로 조절하는 단계;

[0026] f) 상기 e)단계의 혼합물에 상기 b)단계에서 고정화시킨 효소를 혼합하여 반응 온도가 35 내지 65℃인 조건에서 반응시키는 단계; 및

[0027] g) 상기 반응물에 진공 시스템을 0 내지 10 torr로 유지하면서, 칸디다 안타르크티카(Candida Antarctica) 유래

고정화효소를 추가로 첨가하여 반응시키는 단계를 포함하는 재구성 인지질의 합성 방법을 제공한다.

[0028] 바람직하게는, 상기 지방산은 알파-리놀렌산(α -Linolenic acid, ALA, 18:3(n3)), 도코사헥사에노산(Docosa Hexaenoic Acid, DHA, 22:6(n-3)), 에이코사펜타에노산(Eicosa Pentaenoic Acid, EPA, 20:5(n-3)), SDA (stearidonic acid), ETA (eicosatetraenoic acid)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있고, 도코사헥사에노산(Docosa Hexaenoic Acid:DHA)인 것이 더욱 바람직하다.

[0029] 상기 a)단계에서 사용되는 효소로는 씨모마이세스 라누기노서스(*Thermomyces lanuginosus*)로부터 유래한 Lipozyme TL IM, 리조무코르 미에헤이(*Rhizomucormiehei*)로부터 유래한 Lipozyme RM IM, 칸디다 안타르크티카(*Candida Antarctica*)로부터 유래된 Novozym 435를 포함하는 리파아제(lipase), porcine pancreas로부터 유래된 포스포리파아제 A_2 (Phospholipase A_2)및 씨모마이세스 라누기노서스(*Thermomyces lanuginosus*)또는 푸사리움 옥시스포럼(*Fusariumoxysporum*)으로부터 유래된 포스포리파아제 A_1 (phospholipase A_1)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 일 수 있고, 씨모마이세스 라누기노서스(*Thermomyces lanuginosus*) 또는 푸사리움 옥시스포럼(*Fusariumoxysporum*)으로부터 유래된 포스포리파아제 A_1 (phospholipase A_1)인 것이 더욱 바람직하다.

[0030] 상기 효소는 상기 인지질 및 지방산의 중량 대비 2.5 내지 20 중량%로 포함하는 것이 바람직하다. 상기 범위로 포함될 경우, 효소량이 증가하면서 포스파티딜콜린에 결합된 DHA의 함량이 증가하는 효과가 있다.

[0031] 상기 b)단계에서 효소를 고정화시키기 위하여 사용되는 고정체로는 비극성 고정체로서 Lewatit VP OC 1600(Novo Nordis Bioindustry Ltd. Korea), Accrue! MP 1000(Membrana GmbH Accrue! system, Germany), Amberlite XAD4(Sigma Aldrich, Korea) 또는 Octyl silica(Sigma Aldrich, Korea)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 사용할 수 있고, 극성 고정체로서 Duolite A568(Rohm and Haas France S.A.S., France), Amberlite XAD 7HP(Sigma Aldrich, Korea), Celite 545(Sigma Aldrich, Korea), Dowex 50w x8(Sigma Aldrich, Korea)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 사용할 수 있다.

[0032] 상기 b)단계에서 효소를 고정화시키기 위하여 사용되는 pH의 범위는 5.5 내지 8.5이고, 더욱 바람직하게는 6.5 내지 8.5이다. 상기 pH의 범위일 경우, 고정화된 단백질의 양이 증가하여 가장 많은 양의 효소가 고정화되는 효과가 있다.

[0033] 또한, 효소 용액의 농도는 고정체 중량을 기준으로 희석 비율이 30 내지 90%인 것이 바람직하다. 상기 효소 용액의 농도 범위일 때, 포스파티딜콜린에 DHA의 교환 에스테르화 반응이 가능하고, 특히 용액의 농도가 증가할수록 고정체에 고정화되는 효소의 양은 증가하였다.

[0034] 상기 인지질로 포스파티딜콜린(phosphatidyl choline) 및 지방산으로 도코사헥사에노산(Docosa Hexaenoic Acid:DHA)은 기질로서 효소와 반응하며, 몰비율은 1:2 내지 1:8인 것이 바람직하다. 몰비율이 1:2 내지 1:8일 때, 원하는 지방산의 함량을 높인 재구성 인지질의 합성 수율 및 경제성이 우수한 효과가 있다.

[0035] 이하 본 발명을 다음의 실시예에 의하여 보다 구체적으로 설명하고자 한다. 그러나 이들은 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 제한되는 것은 아니다.

[0036] 실험예

[0037] 실험예 1: 효소의 고정화

[0038] 비극성 고정체에 의한 고정화

[0039] 비극성 고정체로서 Lewatit VP OC 1600(Novo Nordis Bioindustry Ltd. Korea), Accurel MP 1000(Membrana GmbH Accurel system, Germany), Amberlite XAD4(Sigma Aldrich, Korea), Octyl silica(Sigma Aldrich, Korea)를 사용하였다.

[0040] 비극성 고정체를 이용한 고정화 방법은 비극성 고정체를 95% 에탄올에 3시간 동안 침지시켜 팽윤시킨 후에 phosphate 완충용액(pH 7.5)으로 에탄올을 제거하고 팽윤된 고정체에 완충용액이 채워지도록 하였다. 포스포리파아제 A₁용액의 농도가 70%가 되도록 phosphate 완충용액을 이용하여 희석시켰다. 고정체 무게 1 g에 희석된 포스포리파아제 A₁용액 10 mL를 30℃에서 250 rpm으로 16시간 동안 섞어주었다. 그 후, 고정체 무게 1 g을 기준으로 phosphate 완충용액 40 mL를 이용하여 세척해주었다. 고정화된 포스포리파아제 A₁은 상온에서 24 시간 동안 건조된 후 진공 건조기에서 24시간 건조시켰다. 반응 전까지는 냉장 보관하였고, 반응을 위하여 수분 활성도 0.64인 밀폐된 용기에 보관하였다. 도 2에서는 재구성 인지질 합성에 사용될 효소를 고정화시키는 방법을 간략하게 개요도로 나타내었다.

[0041] 극성 고정체에 의한 고정화

[0042] 극성 고정체로 Duolite A568(Rohm and Haas France S.A.S., France), Amberlite XAD 7HP(Sigma Aldrich, Korea), Celite 545(Sigma Aldrich, Korea), Dowex 50w x8(Sigma Aldrich, Korea)를 사용하였다.

[0043] 극성 고정체를 이용한 고정화 방법은 고정체의 팽윤과정을 제외하고는 비극성 고정체의 방법과 동일한 방법으로 실시하였다.

[0044] 실험예 2: 효소의 고정화도 측정방법

[0045] 효소의 고정화도를 측정하기 위하여 초기 포스포리파아제 A₁용액의 단백질을 정량한다. 포스포리파아제 A₁을 고정화시킨 후에 완충용액에 남아 있는 단백질량과 세척 후 완충용액으로 빠져나온 단백질량을 합하여 정량한다. Lowry법에 사용된 시약 A는 2% Na₂CO₃ 2g과 0.1N NaOH 0.4 g을 증류수 100 mL에 섞어서 만든다. 시약 B1은 1% CuSO₄ · 5H₂O 0.5g을 증류수 50 mL에 섞어서 만든다. 시약 B2는 2% NaK tartrate · 4H₂O를 증류수 50 mL에 넣어 제조한다. 시약 A, B1, B2의 형태로 보관 후 사용하기 직전에 각각 100 : 1 : 1의 부피비율로 섞어 시약 C를 만들어 사용한다. 시료 200 uL에 1 mL의 시약 C를 섞어 vortexing 후 10분 동안 방치한 후 Folin 시약 50 uL를 넣어 vortexing 후 30분 동안 방치하여 발색(파란색)시켰다. 발색된 시료는 750 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

[0046]

[0047] <계산식 1>

$$\frac{W1 - W2}{W3 + (W1 - W2)}$$

[0048] 고정화된 효소량 (mg/g) =

[0049] W1: 포스포리파아제 A₁ 원액의 단백질량(mg)

[0050] W2: 고정화 후 완충용액에 남아 있는 단백질량(mg)

[0051] W3: 고정체 무게(g)

[0052]

[0053] 실험예 3: 교환 에스테르화 반응

[0054] 인지질(phosphatidylcholine, PC)과 73% DHA 함유 지방산을 50℃에서 각각 녹여 일정한 몰비율로 섞어서 시료를 만들고 Karl fisher를 통하여 수분 함량을 측정하였다. 기질 혼합물 3 g을 반응기에 넣고 효소 일정량(기질 혼합물의 양을 기초로 하여 계산된 양)을 넣어 250 rpm에서 교반시켜 일정 시간 동안 반응시킨 후 시료를 취하였다. 반응 온도는 반응기의 water-jacket과 연결된 water circulator의 온도를 조절하여 설정하였다. 일차 반응 후 기능성 PC 수율 증대를 위하여 에스테르화 반응 후 5 torr의 진공에서 교반과 함께 계속 반응시키면서 일정

한 반응 시간 후에 시료를 취하였다. 본 발명에서 측정한 PC의 수율은 글리세린의 1번과 2번 탄소에 모두 지방산이 에스터화 되어있는 포스파티드를 포함하여 계산하였다.

[0055] 실험예 4: 분석방법

[0056] a) TLC를 이용한 PC 추출

[0057] 반응물 50 mg을 chloroform 150 μ L에 녹인 후 TLC plate(silica gel 60 F₂₅₄, Merck, Germany)에 loading 시키고 chloroform/methanol/acetic acid/water (75:40:8:3, by vol)의 용액으로 전개시켰다. Plate에 분리된 PC와 LPC를 scrap한 후에 내부 표준 물질(C17:0) 1 mg을 넣고 BF₃(14% Boron fluoride in methanol)를 이용하는 방법으로 methylation시켜 GC 분석용 시료를 만들었다.

[0058]

[0059] b) GC-FID 분석조건

[0060] GC(gas chromatograph, Buruker cp-3800, USA)에 SuperlcowaxTM 10(30m $\times$ 0.25 mm, 0.25 μ m, Supelco, USA) 컬럼을 장착하였으며, 컬럼 오븐 온도는 180 $^{\circ}$ C에서 1분간 정치하고 230 $^{\circ}$ C까지 1.5 $^{\circ}$ C/min으로 승온시킨 후 5분 동안 정치시켰다. 주입부의 온도는 240 $^{\circ}$ C이며 불꽃 이온화 검출기의 온도는 250 $^{\circ}$ C로 설정하였다. 이동상 가스는 헬륨을 1.5 mL/min으로 흘려주면서 50:1의 split ratio에서 분석하였다.

[0061] <계산식 2>

$$PCyield(mol\%) = \frac{\text{반응 후 PC의 양}(mol)}{\text{반응 전 PC의 양}(mol)} \times 100$$

[0062]

[0063] <계산식 3>

$$Incorporation\ of\ DHA\ (or\ MCPA)\ (mol\%) = \frac{PC\ and\ 결합된\ DHA\ (or\ MCPA)\ 의\ 양\ (mol)}{PC\ and\ 결합된\ 총\ 지방산\ 의\ 양\ (mol)} \times 100$$

[0064]

[0065]

[0066] **비교예 1. 재구성 인지질을 합성하기 위한 효소 선정**

[0067] 본 발명은 포스파티딜콜린과 기능성 지방산을 이용한 교환 에스테르화 반응으로 재구성 인지질을 합성하고자 하는 것으로 본 비교예 실험은 타겟(target) 지방산을 인지질에 효율적으로 결합시키기 위하여 가장 활성도가 높은 효소를 선정하기 위한 실험으로서 상기 결과는 도 3에 나타내었다. 사용된 효소들은 칸디다 루고사(*Candida rugosa*)로부터 유래한 Lipase OF, 슈도모나스 플루오레스센스(*Pseudomonas fluorescens*)로부터 유래한 Lipase AK, 버크홀데리아 세파시아(*Burkholderia cepacia*)로부터 유래한 Lipase PS, 페니실리움 카렘베르티 (*Penicillium camemberti*)로부터 유래한 Lipase G이었다. 기질 총 3 g은 포스파티딜콜린과 73% DHA 함유 어유 지방산을 1:8의 물비율로 혼합한 것을 사용하였으며, 50 $^{\circ}$ C의 shaker에서 250 rpm으로 교반하면서 24시간 동안 반응시켰다. 효소들은 기질의 무게를 기준으로 3%의 양을 사용하였다. 효소들 중 Lipase OF, Lipase AK, Lipase PS, Lipase G는 분말 효소이었다. 도 3에 나타난 바와 같이 이들 효소를 이용하여 반응시킨 경우 원하는 지방산인 공액리놀렌산 (Conjugated linoleic acid:CLA)이 전혀 합성되지 않는 결과를 나타내었다.

[0068] **비교예 2: 재구성 인지질을 합성하기 위한 효소 고정화 중 고정체 선정**

[0069] 본 비교예 2는 고정체에 의한 포스포리파아제 A₁의 고정화도 및 활성도의 효과를 확인하기 위하여 행하여 진 것으로 사용된 고정체는 Dowex 50w x8와 Celite 545는 극성이고, 그 결과는 도 4에 나타내었다. 두 고정체의 경우 포스포리파아제 A₁의 고정화는 가능하나 재구성 인지질이 전혀 합성되지 않는 것을 확인할 수 있었다.

[0070]

[0071]

실시예 1. 재구성 인지질을 합성하기 위한 효소 선정

[0072]

본 실시예 1은 인지질과 원하는 지방산의 교환 에스테르화 반응을 통한 재구성 인지질 합성을 위한 효소를 선정하기 위한 실험을 수행하였다. 기질 총 3 g으로 포스파티딜콜린과 73% DHA함유 어유 지방산을 1:8의 몰비율로 혼합한 것을 사용하였으며, 50℃의 shaker에서 250 rpm으로 교반하면서 24시간 동안 반응시켰다. 효소들은 기질의 무게를 기준으로 3%의 양을 사용하고 그 결과는 도 3에 나타내었다. 사용된 효소들은 porcine pancreas로부터 유래된 포스포리파아제_{A2}(Lecitase10L, Phospholipase_{A2}), 썬모마이세스 라누기노시스(*Thermomyceslanuginosus*) 또는 푸사리움 옥시스포럼(*Fusariumoxysporum*)으로부터 유래된 포스포리파아제_{A1}(LecitaseUltra, phospholipaseA1), 썬모마이세스 라누기노시스(*Thermomyceslanuginosus*)로부터 유래한 Lipozyme TL IM, 리조무코르 미에헤이(*Rhizomucormiehei*)로부터 유래한 Lipozyme RM IM, 칸디다 안타르크티카(*Candida Antarctica*)로부터 유래된 Novozym 435이었다. 효소들 중 Novozym 435, Lipozyme RM IM 및 Lipozyme TL IM은 고정화 효소이며, 포스포리파아제_{A1}과 포스포리파아제_{A2}는 액상 효소이었다. 도 3에서 나타난 것과 같이 본 실시예 1에서 사용된 5가지 효소에서 모두 DHA와 교환 에스테르화 반응이 가능하였으며, 특히 고정화된 포스포리파아제_{A1}이 포스파티딜콜린에 DHA를 다량으로 결합시키는 것으로 확인되었다.

[0073]

따라서 본 발명을 위하여 포스포리파아제_{A1}을 효소로 사용하였고, 본 실험에 앞서 포스포리파아제_{A1}의 효율적인 고정화 조건에 관한 실험을 수행하였다.

[0074]

실시예 2. 재구성 인지질을 합성하기 위한 효소 고정화 중 고정체 선정

[0075]

고정체에 따라 포스포리파아제_{A1}을 고정화시키는 능력과 반응에 나타나는 활성의 차이를 확인하기 위하여, 극성 고정체로는 Amberlite XAD 7HP, Duolite A568를 사용하였고, 비극성 고정체로는 Lewatit VP OC 1600, Octyl silica, Accrurel MP 1000, Amberlite XAD4를 사용하였다.

[0076]

그 결과는 도 4에 나타내었으며, 포스포리파아제_{A1}은 사용한 모든 고정체에 고정화가 되었으나, 특히 우수한 고정화도는 Lewatit VP OC 1600, Amberlite XAD 7HP, Duolite A568 고정체를 사용한 경우에 나타났다. 또한 포스파티딜콜린에 DHA의 교환 에스테르화 반응 효과에도 큰 차이를 보였으며, 특히 우수한 결과는 Lewatit VP OC 1600, Amberlite XAD 7HP, Duolite A568를 사용한 경우에 나타났다.

[0077]

본 실시예 2의 결과로부터 본 발명의 대표적인 고정체로 Duolite A568을 이용하여 고정화의 조건 및 재구성 인지질의 합성 조건에 대한 실험을 수행하였다.

[0078]

[0079]

실시예 3. 재구성 인지질을 합성하기 위한 효소 고정화 중 pH 선정

[0080]

효소를 고정화시킬 때 pH에 따라 Duolite A568 고정체에 고정화되는 정도와 포스파티딜콜린에 DHA를 결합시키기 위하여 나타내는 활성에 대하여 조사한 결과를 도 5에서 나타내었다. 고정체에 고정화된 단백질(효소)의 양은 pH가 높아질수록 증가하여 pH 6.5 내지 8.5까지 고정화된 단백질의 양이 증가하여 pH 8.5에서 가장 많은 양의 효소가 고정화된 것으로 나타났다. 그러나 포스파티딜콜린에 결합된 DHA의 양을 확인한 결과 pH 8.5에서 가장 반응성이 낮은 것으로 나타났다.

[0081]

따라서 포스포리파아제_{A1}은 pH 7.5에서 고정화시키는 것이 가장 효율이 높은 것으로 나타났다.

[0082]

[0083]

실시예 4. 재구성 인지질을 합성하기 위한 효소 고정화 중 효소 용액의 농도 선정

[0084]

Duolite A568 고정체에 최대 결합할 수 있는 포스포리파아제_{A1}용액의 농도에 대하여 조사한 결과를 도 6에 나타내었다. 고정체 1 g을 기준으로 10 mL의 효소 희석액을 혼합하여 반응시켰고, 효소 희석액은 포스포리파아제_{A1}용액을 pH 7.5인 phosphate 완충 용액으로 일정 비율 희석시켜 제조하였으며, 그 희석 비율은 10, 30, 50, 70 및 90%로 하였다.

[0085]

도 6의 결과에서 나타난 바와 같이 포스포리파아제_{A1}용액의 농도가 높아질수록 고정체에 고정화되는 단백질(효

소)의 양이 증가함을 확인할 수 있었다. 포스포리파아제 A₁용액의 농도가 10에서 50%로 증가하였을 때는 고정화된 단백질의 양이 21에서 125 mg/g까지 증가하였으나, 50에서 90%까지 범위에서는 125에서 147 mg/g만 증가하여 포스포리파아제 A₁용액이 50% 이상일 때는 효소의 증가량에 비하여 고정화되는 단백질의 양의 증가율이 감소한 것을 확인할 수 있었다.

[0086] 포스파티딜콜린에 DHA를 결합시키는 반응성의 측면에서는 포스포리파아제 A₁용액의 농도가 10%일 때는 DHA의 교환 에스테르화 반응이 일어나지 않는 것을 확인할 수 있었다.

[0087] 따라서 포스파티딜콜린에 DHA의 교환 에스테르화 반응이 가능한 포스포리파아제 A₁용액의 농도는 30% 이상이며, 더 적합하게는 50 내지 90% 범위이다. 하지만, 효소액이 70% 와 90%로 희석된 경우에는 보관 중에 활성이 변하는 일이 없었지만, 50%로 희석하여 고정화시킨 효소의 경우 보관하는 시간이 길어지면서 효소의 활성이 감소되는 것을 확인하였다.

[0088] 따라서 포스포리파아제 A₁용액은 pH 7.5 완충용액으로 70%로 희석하여 고정화시키는 것이 가장 효율적인 결과를 나타내었다.

[0089]

[0090] 실시예 5. 초기 수분 함량에 따른 재구성 인지질 합성

[0091] DHA를 결합시킨 포스파티딜콜린을 합성하기 위하여 다양한 수분 함량에서 실험한 결과를 도 7에서 나타내었다. 본 실시예 5는 대기압 조건에서 포스파티딜콜린과 73% DHA 함유 지방산을 1:8의 몰비율로 혼합한 기질에 고정화시킨 포스포리파아제 A₁ 10%를 함께 넣고 55℃에서 250 rpm으로 교반시키면서 반응시켜 반응 시간에 따라 포스파티딜콜린의 수율과 포스파티딜콜린에 결합된 DHA의 함량을 측정하였다.

[0092] 포스파티딜콜린의 수율은 초기 3시간의 반응 동안 가수분해에 의하여 급격히 감소하였고 그 이후에도 꾸준히 감소하는 경향을 보였다. 반응 3시간 후에 포스파티딜콜린의 수율은 수분 함량이 증가할수록 감소하였고, 반응 24시간 후에 포스파티딜콜린의 수율은 수분 함량이 0.2%일 때 가장 높았으나 36 mol%이었고, 0.6%의 수분 함량에서는 30 mol%, 0.8% 이상의 수분함량에서는 25 mol%의 포스파티딜콜린 수율을 나타내었다.

[0093] 포스파티딜콜린에 결합된 DHA의 함량은 반응 시간이 길어질수록 증가하는 경향을 나타내었다. 반응 초기에 DHA의 결합 속도는 수분 함량이 증가할수록 빠르게 나타났으며, 반응 9시간 이후 0.8% 이상의 수분 함량일 때 반응 시간의 증가와 함께 포스파티딜콜린에 결합된 DHA의 함량이 계속해서 증가하기는 하지만 수분 함량에 따라 포스파티딜콜린에 결합된 DHA의 함량이 변화하지는 않았다. 결국 24시간 후에는 0.8% 이상의 수분 함량일 때 포스파티딜콜린에 결합된 DHA의 함량이 28 mol%로 가장 높은 값을 나타내었다.

[0094] 따라서 9시간 이후의 포스파티딜콜린의 수율 변화 및 포스파티딜콜린에 결합된 DHA의 함량 변화를 관찰한 결과, 0.8 내지 1.0%의 수분 함량이 가장 적합한 범위로 판단되었다.

[0095]

[0096] 실시예 6. 반응 온도에 따른 재구성 인지질 합성

[0097] DHA가 결합된 포스파티딜콜린을 합성하기 위한 반응 온도에 관한 실험 결과는 도 8에 나타내었다. 본 실시예 6은 1:8의 몰비율로 혼합시킨 포스파티딜콜린과 73% DHA함유 지방산을 고정화된 포스포리파아제 A₁과 섞어 35, 45, 55, 65℃의 온도에서 실험하였다. 고정화된 효소의 양은 총 기질의 양을 기준으로 10%의 양을 사용하였으며, 수분 함량은 0.8%로 하고 대기압 상태에서 250 rpm으로 교반시키면서 반응을 하였다.

[0098] 그 결과 온도가 증가할수록 포스파티딜콜린의 수율이 더 많이 감소하는 경향을 나타내었으며, 55와 65℃에서 포스파티딜콜린의 수율 변화는 유사한 경향을 나타내었다. 포스파티딜콜린에 결합된 DHA의 함량은 포스파티딜콜린의 수율과 반대로 반응 온도가 높을수록 증가하는 경향을 보였으며, 55와 65℃는 포스파티딜콜린의 수율 변화에서와 마찬가지로 포스파티딜콜린에 결합된 DHA의 함량 변화에서도 유사한 경향을 보여주었다. 45℃에서의 반응도 반응 12시간까지 관찰한 결과에서는 포스파티딜콜린에 결합된 DHA의 함량이 55나 65℃에 비하여 작게 나타났지만 24시간의 반응에서는 28 mol%로 45, 55, 65℃의 포스파티딜콜린에 결합된 DHA의 함량이 유사한 값을 나타내었다.

[0099]

[0100] 실시예 7. 고정화 효소량에 따른 재구성 인지질 합성

[0101] DHA가 결합된 포스파티딜콜린을 합성하기 위하여 필요한 효소량에 관한 실험 결과는 도 9에 나타내었다. 본 실시예 7은 1:8의 몰비율로 혼합시킨 포스파티딜콜린과 DHA를 고정화된 포스포리파아제_{A1}과 혼합하여 55℃의 온도에서 반응시켰다. 고정화된 효소의 양은 총 기질의 양을 기준으로 2.5, 5, 10, 20%로 설정하였으며, 수분 함량은 0.8%로 하고 대기압 상태에서 250 rpm으로 교반시키면서 반응시켰다.

[0102] 그 결과 포스파티딜콜린의 수율과 포스파티딜콜린에 결합된 DHA의 함량 모두 효소량에 따라 큰 차이를 나타내었다. 효소량이 증가하면서 포스파티딜콜린의 수율도 크게 감소하였고, 포스파티딜콜린에 결합된 DHA의 함량도 크게 증가하였다. 특히 포스파티딜콜린에 결합된 DHA의 함량 변화는 5와 10%에서 큰 차이를 나타내었다. 효소량을 20%까지 증가시켰을 때는 포스파티딜콜린에 결합된 DHA의 함량은 계속 증가하였으나, 포스파티딜콜린의 수율이 크게 감소하여 가수분해가 많이 일어난 것을 확인할 수 있었다.

[0103] 따라서 고정화된 포스포리파아제 _{A1}은 기질의 양을 기준으로 10%의 양을 사용하여 반응시키는 것이 가장 효과적임을 알 수 있었다.

[0104]

[0105] 실시예 8. 진공에 의한 재구성 인지질 재합성

[0106] DHA가 결합된 포스파티딜콜린을 합성하기 위하여 포스파티딜콜린과 73% DHA함유 지방산을 1:8의 몰비율로 혼합하여 Duolite A568로 고정화시킨 포스포리파아제 _{A1}을 기질의 총 질량을 기준으로 10%를 사용하였고, 반응온도 55℃, 수분 함량 0.8%의 조건에서 6시간 동안 반응시킨 반응물에 추가 효소로 Novozym 435를 10%(총 기질량 기준)을 추가한 후, 5 torr의 진공 시스템을 이용하여 반응시킨 결과가 도 10에 나타내었다.

[0107] 포스파티딜콜린의 수율이 6시간의 반응 후에 33 mol%이었으며, 진공 시스템을 이용한 이후에는 PC의 함성율이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 진공 시스템에 의한 생성 수분의 감소에 의하여 에스테르화 반응이 촉진된 것으로 판단되었다. 또한 DHA가 합성된 비율도 증가된 것을 확인할 수 있으며, 고정화된 포스포리파아제_{A1}에 효소로 Novozym 435를 추가하고, 진공 시스템을 사용하는 것이 DHA 함유량을 높인 포스파티딜콜린을 합성하기에 효과적인 방법인 것을 알 수 있었다.

[0108]

[0109] 실시예 9. 다른 고정체를 이용하여 고정화된 효소를 이용한 재구성 인지질의 합성

[0110] 상기에서 Duolite A568을 이용한 고정화 방법과 동일한 방법으로, 고정체 Lewatit VP OC 1600을 이용하여 포스포리파아제_{A1}이 고정화 된 후 재구성 인지질의 합성을 위한 테스트를 실시하였다.

[0111] 재구성 인지질 합성 실험 조건에서 고정화 효소량에 따른 재구성 인지질 합성 효과를 알아보기 위하여 1:8의 몰비율로 혼합시킨 포스파티딜콜린과 DHA를 고정화된 포스포리파아제 _{A1}과 혼합하여 55℃의 온도에서 반응시켰고, 그 결과를 도 11에 나타내었다. 다른 반응 조건들은 Duolite A568을 이용하여 고정화된 효소로 최적화한 조건을 사용하였는데, 즉 고정화된 효소의 양은 총 기질의 양을 기준으로 2.5, 5, 10, 20, 30%로 설정하였으며, 수분 함량은 0.8%로 하고 대기압 상태에서 250 rpm으로 교반시키면서 반응시켰다.

[0112] 그 결과 효소량이 2.5%에서 20%까지 증가함에 따라 포스파티딜콜린에 결합된 DHA의 함량이 급격히 증가함을 확인할 수 있었다. 하지만 효소량이 20%에서 30%로 증가함에 따라서는 포스파티딜콜린에 결합된 DHA의 함량 변화가 크지 않음을 확인할 수 있었다. 포스파티딜콜린의 수율은 효소량이 증가함에 따라 감소하는 것을 확인하였는데, 진공시스템을 이용하면 포스파티딜콜린의 수율을 향상시킬 수 있다는 것을 실시예 8에서 확인하였으므로, 효소량을 20%로 선정하여 진공을 도입시킨 실시예 10을 하기에 실시하였다.

[0113]

[0114] 실시예 10. 진공 도입 시점에 의한 재구성 인지질 재합성 효과

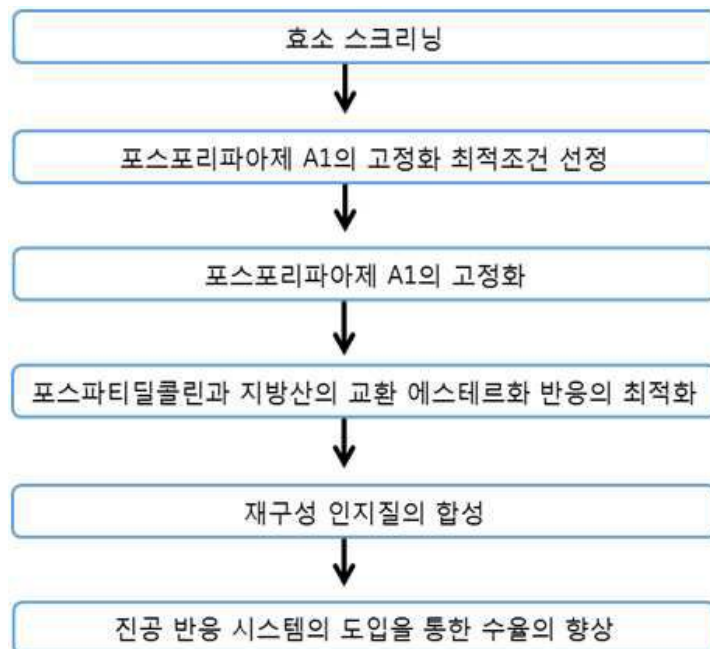
[0115] 포스파티딜콜린과 73% DHA 함유 지방산을 1:8의 몰비율로 혼합하여 Lewatit VP OC 1600로 고정화시킨 포스포리파아제_{A1}을 기질의 총 질량을 기준으로 20%를 사용, 반응 온도 55℃, 수분 함량 0.8%의 조건에서 5 torr의 진공 시스템을 이용하여 진공 반응을 실시하였다. 진공 도입 시점에 따른 재구성 인지질 재합성의 효과를 알아보기

위하여, 진공 도입 시점을 반응 시작 0시간, 반응 시작 3시간, 반응 시작 9시간 이후로 선정하여 실험을 하였다. 진공 도입시간 설정의 기준은 실시예 9에서 실험한 결과를 근거로 하여, 포스파티딜콜린에 결합된 DHA 함량이 급격하게 증가하는 3시간, 그 함량이 거의 평형에 이르는 9시간, 대조군으로써 0시간을 선정하여 실험을 실시하였다. 이에 따른 결과를 도 12에 나타내었다.

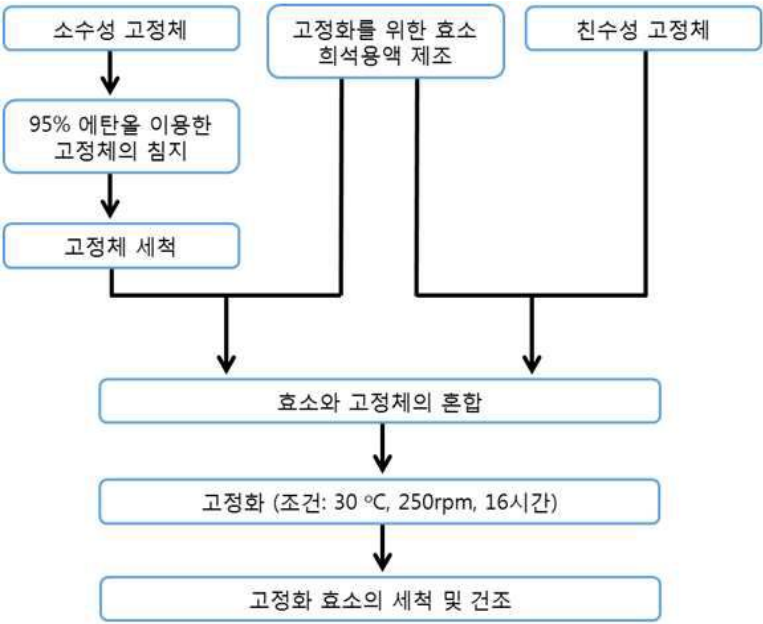
[0116] 그 결과 진공 도입 시점에 따라 같은 진공을 도입하였음에도 불구하고, 결과가 다르게 나타남을 확인하였다. 진공을 도입한 후 반응 시간이 증가함에 따라 대조군을 제외한 3시간과 9시간에서는 포스파티딜콜린에 결합된 DHA의 함량은 약간 감소하였고, 포스파티딜콜린의 수율은 급격하게 증가함을 확인하였다. 진공을 도입시킨 후 반응 시간이 96시간이 경과함에 따라 포스파티딜콜린에 결합된 DHA의 함량은 대조군을 제외한 3시간과 9시간에서는 거의 차이가 없음이 나타났으나, 포스파티딜콜린의 수율은 반응 3시간째에 진공을 걸어준 경우가 반응 9시간째에 진공을 걸어주었을 때 보다 훨씬 높게 나타났다. 따라서 반응 시간 3시간째에 진공을 도입하는 것이 효과적인 방법임을 확인할 수 있었다.

도면

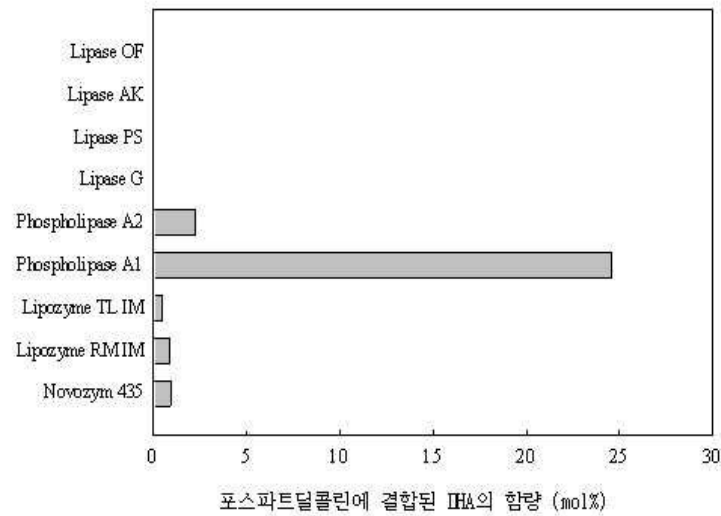
도면1



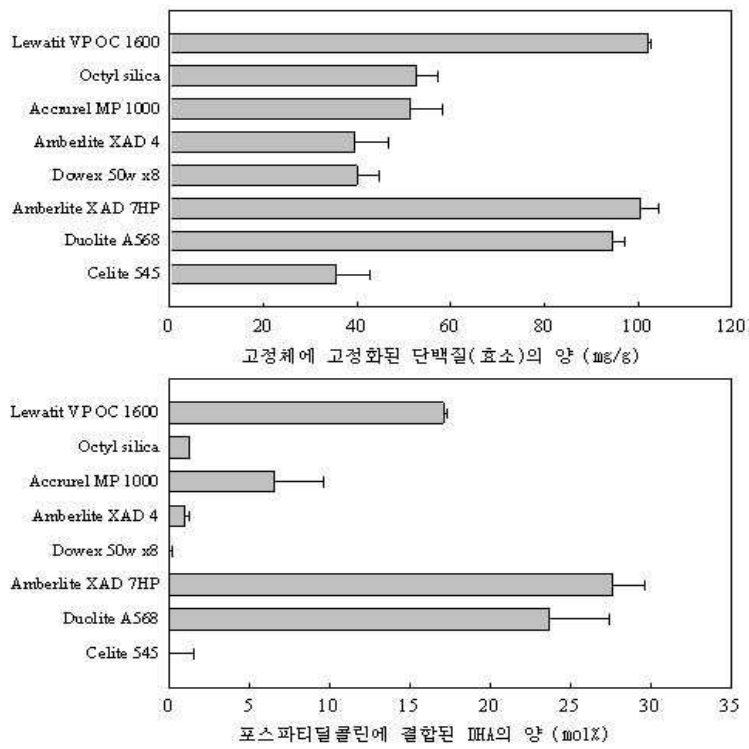
도면2



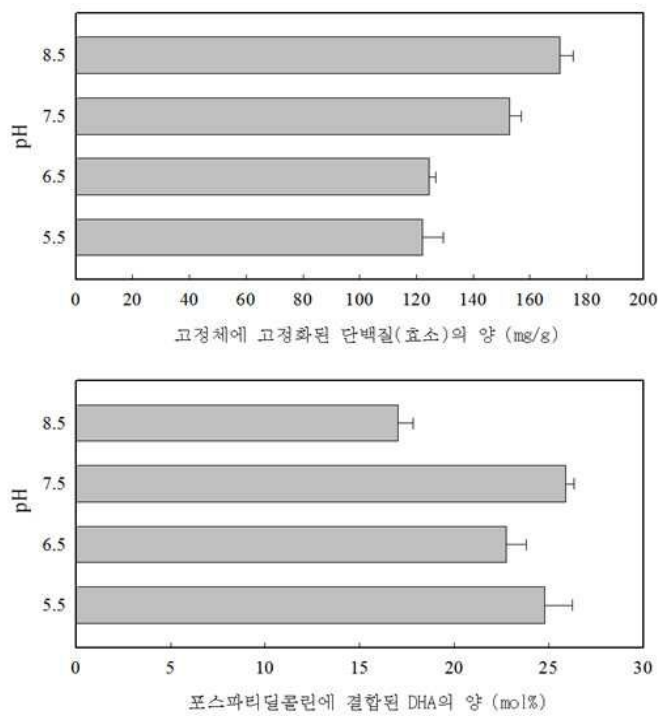
도면3



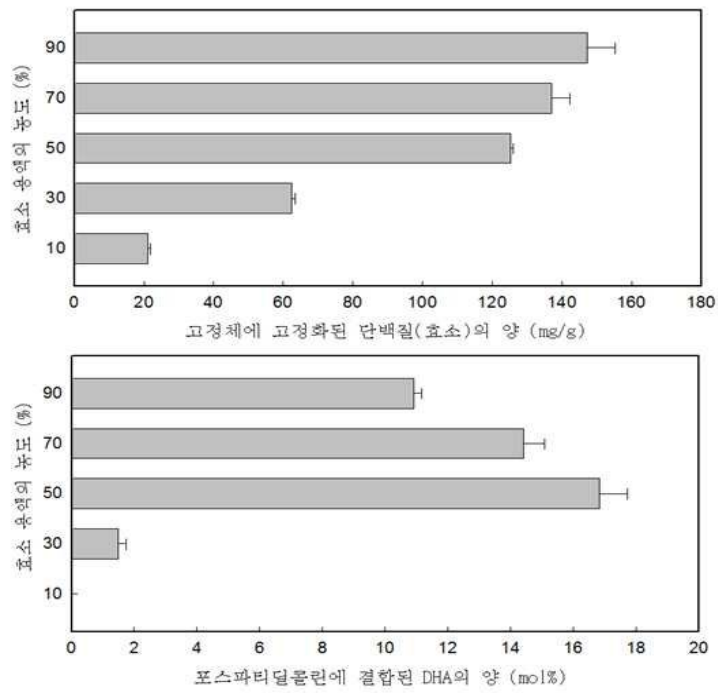
도면4



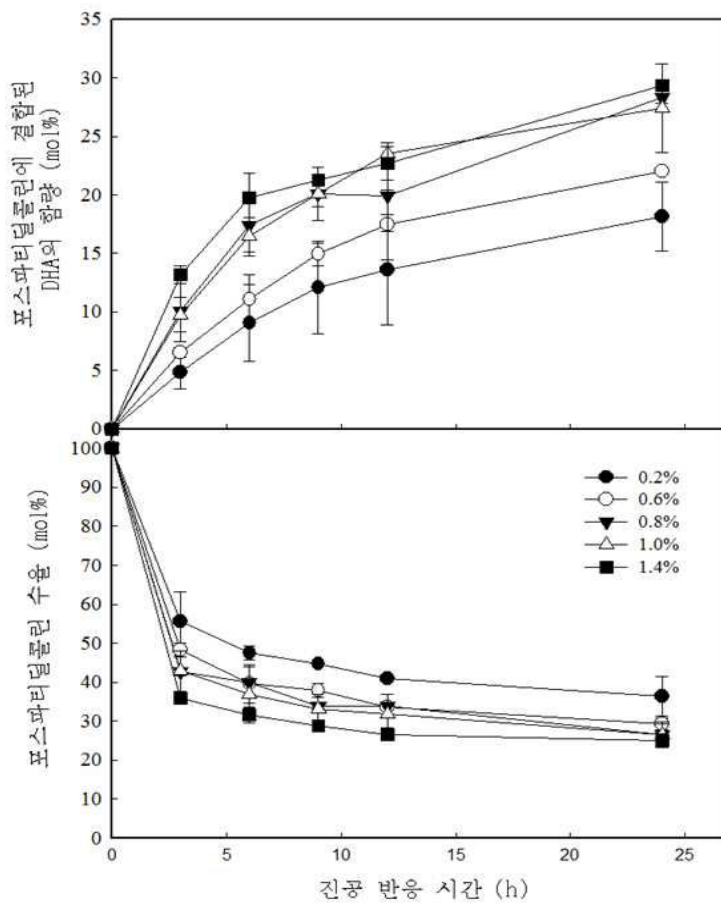
도면5



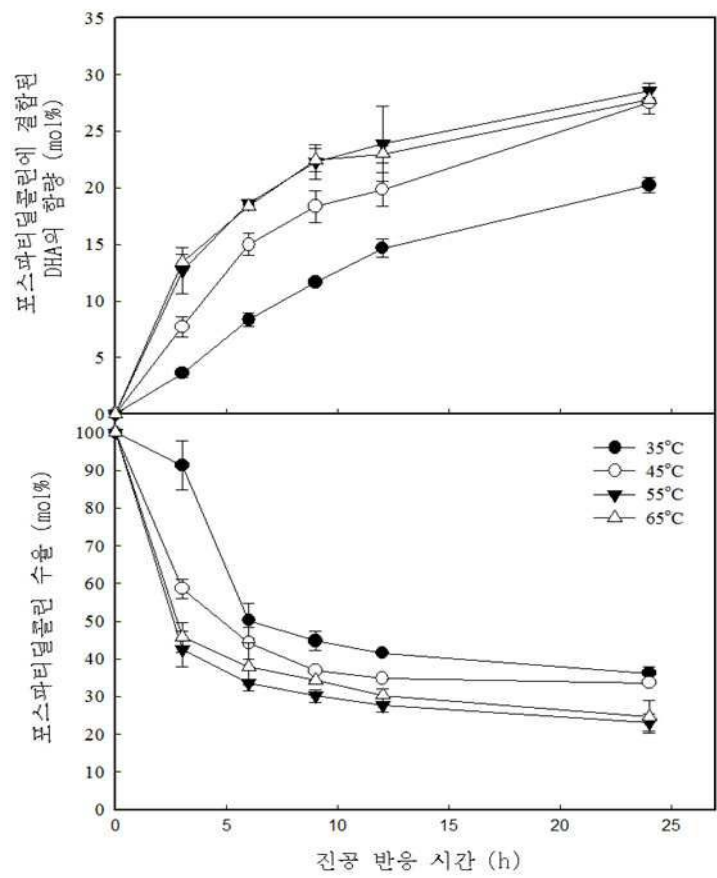
도면6



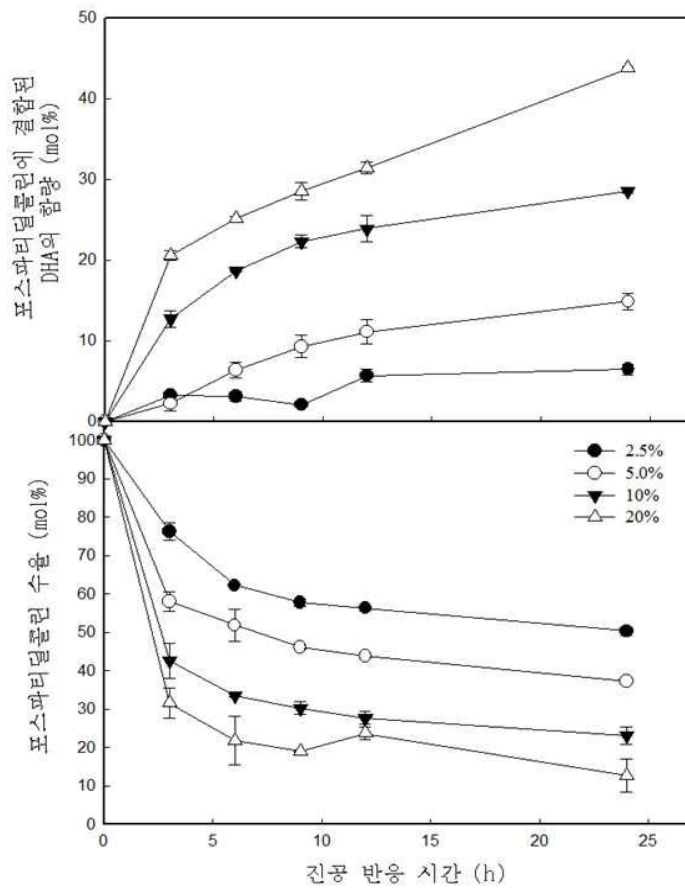
도면7



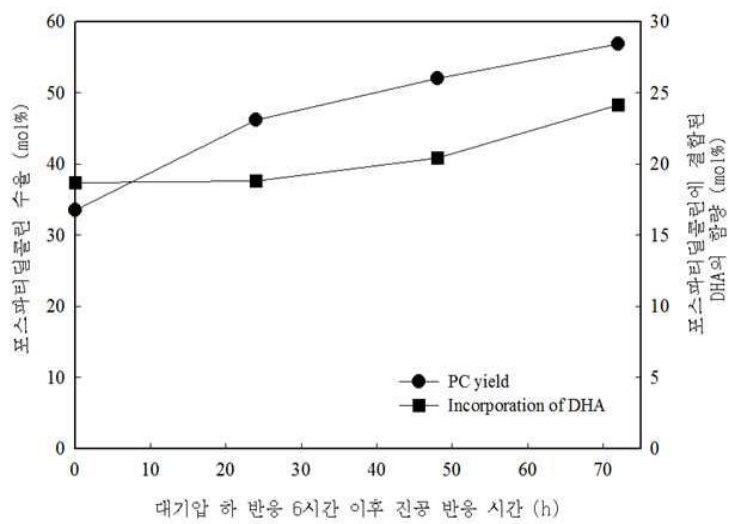
도면8



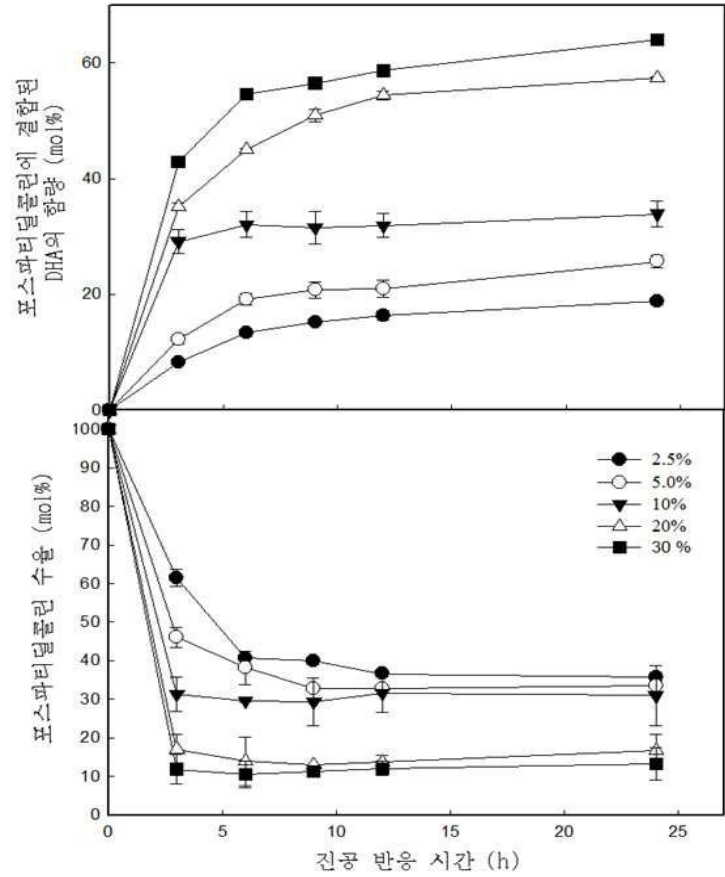
도면9



도면10



도면11



도면12

