

## 미생물에서 추출된 Lipase의 유지방 분해

박종학 · 이영춘

중앙대학교 식품가공학과

### Studies on the Hydrolysis of Milk Fat by Microbial Lipases

Jong-Hack Park and Young-Chun Lee

Department of Food Science and Technology, Chung-Ang University, Seoul

#### Abstract

To utilize microbial lipases for hydrolysis of milk fat, optimum reaction conditions and characteristics of enzymatic reactions of lipases originated from *Rhizopus delemar*, *Mucor* sp., and *Candida cylindracea* were investigated. Optimum pH and temperature were pH 5.6 and 45°C for *Rhizopus delemar* lipase, pH7.5 and 35°C for *Mucor* sp. lipase, and pH7.5 and 35°C for *Candida cylindracea* lipase. Optimum lipase concentration and optimum substrate concentration were 600-800 units/ml and 20% milk fat, regardless of their origin. Km values were 6.06% milk fat for *Rhizopus delemar* lipase, 7.69% for *Mucor* sp. lipase and 7.99% for *Candida cylindracea* lipase. Rate of lipid hydrolysis was *Rhizopus delemar* lipase > *Mucor* sp. lipase > *Candida cylindracea* lipase. As the reaction time was extended, liberation of short chain fatty acids was increased. After 8 hours reaction, capric acid content significantly increased with *Candida cylindracea* lipase, palmitic acid with *Mucor* sp. lipase and butyric acid with *Rhizopus delemar* lipase.

#### 서 론

Lipase(EC3. 1. 1. 3)<sup>(1-3)</sup>는 triglyceride의 ester결합을 가수분해하는 효소로서 글리세롤과 지방산을 생성한다. Lipase의 기질에 대한 작용기작은 Desnuelle<sup>(4)</sup>과 Brockerhoff<sup>(5)</sup>등에 의해 밝혀져, 저급지방산의 triglyceride나 monoester의 저농도에서는 거의 작용치 않고, 기질이 포화농도를 초과하여 불용성 상태로 되고, 물과의 사이에서 계면(界面)을 만드는 상태로 되면 현저하게 작용한다고 보고 하였다. Lipase는 동물조직, 식물조직 및 미생물등에 광범위 하게 존재하며 이들은 각각의 기원에 따라서 그의 효소적 성질도 다양하다. 이러한 것은 각종 lipase의 화학구조가 서로 다름을 의미하고, 각각의 반응조건이 다름을 나타낸다.

Lipase를 유지방에 작용시킨 연구로는 우유 자체내에 함유되어 있는 milk lipase에 관한 연구에서, 이 lipase가 우유의 유통중에 유지방에 작용하여 사람이 관능적으로 느낄수 있을 정도의 유리지방산의 축적등에 관한 보고<sup>(6,7)</sup>가 있으며, 또한 각종의 lipase를 유지방에 작용시켜 생성된 유리지방산을 유제품향으로 이용할 수 있다는 보고<sup>(8-14)</sup>들이 있다.

본 연구에서는 *Rhizopus delemar*, *Mucor* sp. 및

*Candida cylindracea*에서 추출된 3종의 lipase를 유지방 분해에 이용하기 위한 기초연구로서, 이들의 유지방분해에 적합한 반응조건을 결정하고 이들이 반응하여 생성하는 유리지방산으로 그들의 반응특이성을 조사하였다.

#### 재료 및 방법

##### 재 료

Lipase는 *Rhizopus delemar*에서 추출한 것(Tanabe Seiyaku Co., Japan), *Mucor* sp.에서 추출한 것(Amano Pharmaceutical Co., Japan)과 *Candida cylindracea*에서 추출한 것(Sigma Chemical Co., U.S. A.)을 시험에 사용하였다. 그리고 기질로 사용한 유지방은 유지방 함량 35%의 생크림(서울우유, 서울)으로 하였다. 기질중의 유지방 함량측정은 Gerber test<sup>(15)</sup>에 의하였다.

##### Lipase의 활성측정

Lipase의 활성측정은 Yamada등<sup>(16)</sup>의 PVA(poly vinyl alcohol)-olive oil emulsified system에 의하였으며, 효소의 1단위는 1분간에 1 $\mu$ M의 지방산을 유리하는 양으로 하였다. 유지방에 대한 활성의 측정은

lipase작용에 의해 생성된 지방산을 알카리로 적정하여 lipase의 활성을 구하였으며, 본 실험에서는 효소의 활성이 최대가 되는 것을 100으로 하여 상대활성으로 나타내었다.

**최적반응조건의 결정**

Lipase의 반응 최적온도를 결정하기 위해 McIlvaine buffer를 이용하여 lipase가 600 units /1ml 되도록 희석하고, 기질은 유지방함량 20%로 조절하였다. 최적온도의 결정은 20~60°C에서 온도에 따른 활성을 측정하여 활성이 가장 높은 온도로 하였다.

Lipase의 최적 pH는 기질을 buffer( pH 4~8 : McIlvaine buffer, pH 8~10 : Menzel buffer)에 유지방 함량 20%로 조절한 후, 각 lipase의 최적온도에서 10분간 예열하고 600 units/ml로 희석된 효소액 1 ml를 첨가하여 반응시키면서 각각의 pH에 따른 활성을 측정하여 활성이 가장 높은 pH로 하였다.

유지방에 대한 lipase반응의 적정효소농도를 선정하기 위하여 기질(유지방함량 20%) 50 ml에 대해 50~1000 units/ml의 효소액 1 ml씩을 가해 각 lipase의 최적조건에서 반응시키면서 각 효소단위별로 0.05 N-NaOH로 적정하여 초기반응속도를 측정하였다. 적정효소농도는 초기반응속도가 효소농도에 의해 거의 영향을 받지 않는 점으로 하였다.

Lipase작용에 대한 유지방의 적정농도를 선정하기 위하여 기질을 유지방 함량 5~35%로 조절하였다. 각

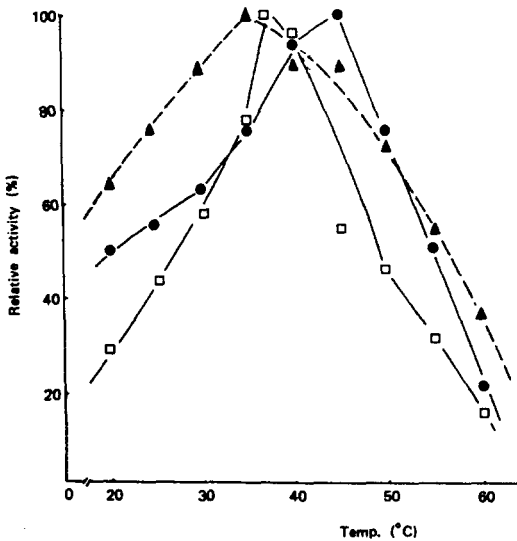


Fig. 1. Effect of temperature on lipase activity  
 ●—● : *Rhizopus delemar* lipase  
 ▲—▲ : *Mucor* sp. lipase  
 □—□ : *Candida cylindracea* lipase

각의 기질 50 ml과 적정효소농도의 효소액 1 ml를 첨가하여 교반하면서 반응시키고, 각 기질농도에 따른 초기반응속도를 측정하여 초기 반응속도가 기질농도에 의하여 거의 영향을 받지 않는 점으로 정하였다.

**반응시간에 따른 lipase의 작용**

Lipase를 유지방에 작용시켜 반응시간에 따른 lipase의 작용을 보기위해 온도, pH, 효소농도, 기질농도 등을 최적조건으로 하여 500 rpm으로 교반하면서 반응시켰다. 일정시간 간격으로 시료를 10 ml씩 채취하여 acetone-ethanol 동량혼합액 20 ml를 가해 효소를 불활성화 한 후 phenolphthalein을 이용하여 0.05 N NaOH로 적정하여 lipase의 작용에 의해 생성된 생성물을 비교하였다. 또한 효소의 반응특이성을 보기위하여 반응시간에 따라 생성된 유리지방산을 분석하였다. 유리지방산의 분석은 Bill<sup>(17)</sup>의 방법을 응용하여 전처리한 다음 HPLC(Varian 5000 Liquid Chromatography)로 실시하였다.

Table 1. HPLC conditions for analysis of free fatty acid

HPLC	: Varian 5000 Liquid chromatography
Column	: Micro Pak MCH-5 (4.0mm I.D×0.25in. O.D×15.0cm length)
Temp.	: 60°C
Injection volume	: 10μl
Mobile phase	: 5% to 100% acetonitrile in water (pH 2.5 with perchloric acid) at 6%/min.
Flow rate	: 1.0ml/min.
Detector	: Programmable wavelength UV detector, 210nm, 0.2Abs.
Recorder	: Varian MODEL 9176
Chart speed	: 1cm/min

**결과 및 고찰**

**최적반응조건**

최적온도 : 3종 lipases의 온도에 따른 활성의 변화는 그림 1과 같다. 즉, 각 lipase의 활성이 가장 높은 최적온도는 *Rhizopus delemar* lipase가 45°C, *Mucor* sp. lipase가 35°C, 그리고 *Candida cylindracea* lipase가 37°C였다. 또한 *Rhizopus delemar* lipase는 50°C에서 75%의 활성을 갖는 한편, *Candida cylindracea* lipase는 45%의 낮은 활성을 나타내었으며, *Mucor* sp. lipase는 3종의 lipase중 가장 넓은 반응온도 범위를 나타내었다.

최적 pH : 3종 lipases의 pH에 따른 활성을 측정한 결과는 그림 2와 같다.

즉, *Rhizopus delemar* lipase는 pH 5.6에서, *Mucor* sp. lipase는 pH 7.5에서, 그리고 *Candida Cylindracea* lipase는 pH 7.0에서 최대활성을 나타내었다. 이 중

*Candida cylindracea* lipase는 3종의 lipase중 가장 넓은 반응 pH범위를 가지고 있었다.

적정효소농도 : 기질농도가 효소반응속도에 영향을 주지 않는 유지방 함량 20%에 50 ml를 사용하여 효소 농도를 50~1000 units/ml로 변화시키면서 초기반응속도를 측정된 결과는 그림 3과 같다. 즉, *Rhizopus delemar*에서 추출된 lipase는 효소농도가 700 units/ml 이상으로 증가되었을 때 반응속도의 변화가 경미한 것을 볼 수 있었으므로, 실제반응에 있어서 적정효소농도를 700 units/ml로 선정하였다. 같은 방법으로 *Mucor* sp.의 적정 lipase농도는 600 units/ml, *Candida cylindracea* lipase의 적정효소 농도는 600 units/ml로 결정하였다.

적정기질농도 : 각각의 적정효소농도에서 유지방의 농도를 변화시키면서 초기 반응속도를 측정된 결과는 그림 4와 같다.

효소의 기원에 따라서 약간의 차이는 있으나 유지방 함량 20%까지는 기질농도의 증가에 따라 초기반응속도의 증가를 보이나, 20%이상에서는 반응속도의 변화가 거의 무시할 정도였다. 따라서 적정기질농도는 모두 유지방 함량 20%로 선정하였다.

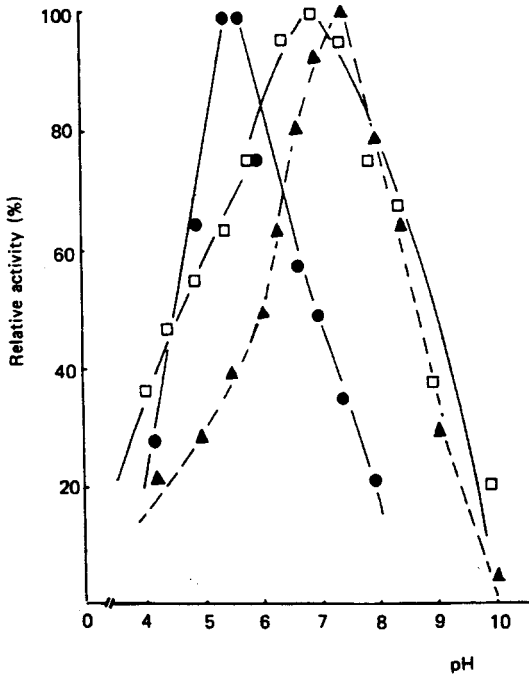


Fig. 2. Effect of pH on lipase activity  
 ●-----● : *Rhizopus delemar* lipase  
 ▲-----▲ : *Mucor* sp. lipase  
 □-----□ : *Candida cylindracea* lipase

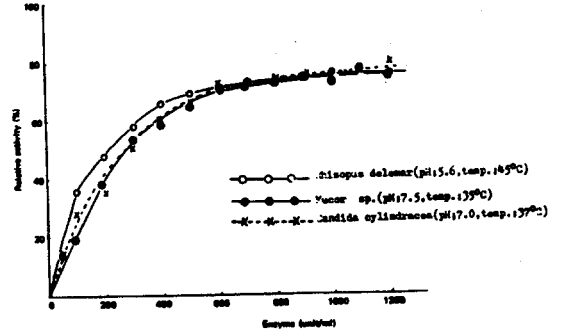


Fig. 3. Initial reaction rate of lipase as affected by enzyme concentration  
 Substrate: 50 ml (milk fat: 20%) Enzyme: 1 ml

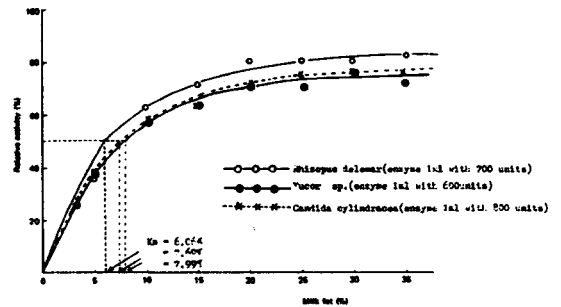


Fig. 4. Effect of substrate concentration on initial reaction rate of lipase Substrate: 50 ml

이것을 Lineweaver-Burk plot한 결과 각 효소의 걸보기 Km값은 *Rhizopus delemar* lipase가 6.06%, *Mucor* sp. lipase가 7.69%, *Candida cylindracea* lipase가 7.99%이었다.

반응 시간에 따른 lipase의 작용

반응시간에 따른 lipase의 반응형태를 보기 위하여 앞에서 결정된 각 조건을 맞추면서 반응시켜 일정시간 간격으로 10 ml씩 시료를 취하여 0.05 N NaOH로 적정한 결과(그림 5), 3종의 lipases 모두가 4시간 반응까지는 반응시간이 증가함에 따라 유지방의 분해물이 급격히 증가하나 4시간 이후에는 분해물의 증가가 거의 무시할 정도였다. 그리고 *Rhizopus dilemar* lipase는 *Candida cylindracea* lipase에 비해 높은 활성을 나타내었다.

3종의 lipases에 의해 유리된 지방산의 profile을 HPLC로 분석한 결과는 표 2와 같다. 즉, 반응 4시간과 8시간에서 시료를 취하여 각각의 유리지방산을 분석한 결과, 3종의 lipases 모두 4시간에서는 myristic acid 및 stearic acid의 함량이 높았으나 8

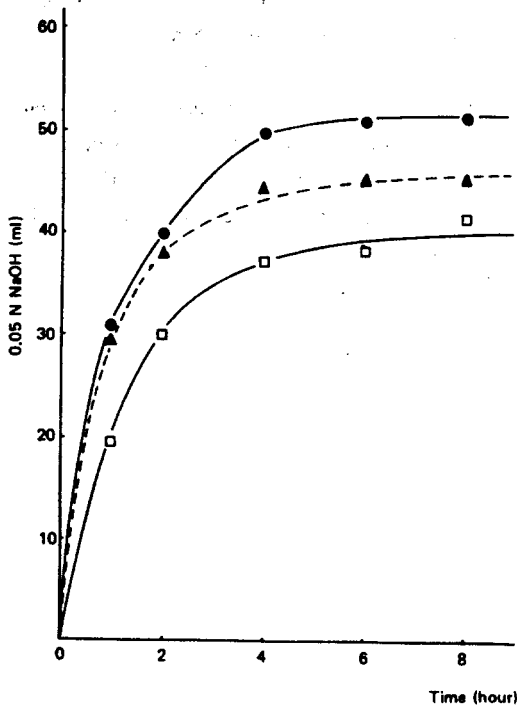


Fig. 5. Hydrolysis curve of milk fat by lipases

●—● : *Rhizopus delemar* lipase  
 ▲—▲ : *Mucor* sp. lipase  
 □—□ : *Candida cylindracea* lipase

Table 2. Free fatty acid profiles released from milk fat by various lipases

Fatty Acid	<i>R. delemar</i> lipase		<i>Mucor</i> sp. lipase		<i>Can. cylindracea</i> lipase	
	4hr.	8hr.	4hr.	8hr.	4hr.	8hr.
C <sub>4</sub>	1.93	30.45	2.61	12.44	9.04	17.48
C <sub>6</sub>	0.40	28.08	8.07	18.47	1.85	2.21
C <sub>8</sub>	0.03	5.60	0.28	5.37	0.78	2.73
C <sub>10</sub>	1.71	14.33	0.10	15.32	29.27	50.54
C <sub>12</sub>	0.06	1.25	0.05	3.91	4.29	0.78
C <sub>14</sub>	13.43	0.70	39.48	10.90	2.36	2.89
C <sub>16</sub>	68.17	18.89	43.02	31.88	31.52	21.65
C <sub>18</sub>	14.27	0.70	6.38	1.73	20.89	1.73

시간에서는 butyric acid 등의 저급지방산의 함량이 높아졌다. 이는 lipase의 작용은 반응초기에서 고급지방산들을 유리하고 점점 반응이 진행됨에 따라 저급지방산이 많이 유리됨을 의미한다.

*Rhizopus delemar* lipase의 경우는 4시간에서 palmitic acid의 함량이 68.17%로 가장 높은 함량을 나타내었으나, 8시간에서는 butyric 및 caproic acid

의 함량이 높게 나타났다. *Mucor* sp. lipase의 경우도 4시간에서 myristic acid 및 palmitic acid의 함량이 각각 39.68%, 43.02%로 나타났으나, 반응 8시간에서 butyric acid, caproic acid 및 capric acid 등의 함량이 높아졌다. *Candida cylindracea* lipase의 경우는 반응 4시간에 capric acid의 함량이 29.27%이고 8시간에 50.54%로 다른 lipases보다 상당히 높은 함량을 보였다.

요 약

미생물에서 추출된 lipase를 유지방분해에 이용하기 위한 기초연구로서 *Rhizopus delemar*, *Mucor* sp. 및 *Candida cylindracea*에서 추출된 3종의 lipases를 유지방분해에 적합한 반응조건을 설정하고, 이들의 반응특이성을 연구한 결과는 다음과 같다. 최적온도 및 최적 pH는 *Rhizopus delemar* lipase가 45°C, pH 5.6, *Mucor* sp. lipase가 35°C, pH 7.5였으며, *Candida cylindracea* lipase는 35°C, pH 7.0이었다. 유지방에 대한 적정효소농도는 3종의 lipase 모두 600~800 units/ml였다. 적정기질농도는 효소의 종류에 관계없이 유지방함량 20%였으며, 이들의 Km값은 *R. delemar* lipase가 6.06%, *M. sp.* lipase가 7.69%, *Can. cylindracea* lipase가 7.99%였다. 반응시간에 따른 반응율을 조사한 결과 *R. delemar* lipase, *M. sp.* lipase, *Can. cylindracea* lipase 순으로 높았으며 반응시간이 진행됨에 따라 저급지방산의 분해율이 높아졌으며, 반응 8시간에서는 *R. delemar* lipase는 butyric acid, *M. sp.* lipase는 palmitic acid, *Can. cylindracea* lipase는 Capric acid의 함량이 높았다.

문 헌

1. Shahani, K.M.: *Enzymes in Food Processing*, G. Reed, ed.(2nd. ed) Academic press, N.Y., p. 181(1975)
2. Whitaker, J.R.: *Principles of Enzymology for the Food Sciences*, Marcel Dekker. Inc., N.Y., p. 481(1972)
3. Dixon, M. and Webb. E.C.: *Enzymes*, (3rd,ed.) Longman group limited, London, p.251(1977)
4. Desnuelle, P.: *Advances in Enzymology*, 23, 129(1961)
5. Brockerhoff, H.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 136, 366(1969)

6. Shahani, K.M., Harper, W.J., Jensen, R.G., Parry, R.M. and Zittle, C.A.: *J. Dairy Sci.*, **56**, 531(1973)
7. Jensen, R.G.: *J. Dairy Sci.*, **47**, 210(1964)
8. Nelson, J.H.: *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **49**, 559(1972)
9. Seitz, E.W.: *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **51**, 12(1974)
10. Huang, H.T. and Dooley, J.G.: *Biotech. Bioeng.*, **18**, 909(1976)
11. Shahani, K.M., Arnold, R.G., Kilara, A. and Dwivedi, B.K.: *Biotech. Bioeng.*, **18**, 891(1976)
12. Iwai, M.: *Kagaku to kogyo(Osaka)*, **52**, 48(1978)
13. Iwai, M.: *Kagaku to kogyo(Osaka)*, **52**, 93(1978)
14. Kanisawa, T., Yamaguchi, Y. and Hattori, S.: *J. Japan Soc. Food Sci. Tech.*, **29**, 693(1982)
15. Atherton, H.V. and Newlander, J.A.: *Chemistry & Testing of Dairy Products*, AVI publishing Co., Inc., Wesport, Connecticut, p.71(1971)
16. Yamada, K., Ota, Y. and Machida, H.: *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, **36**, 860(1962)
17. Bills, D.D., Khatri, L.L. and Day, E.A.: *J. Dairy Sci.*, **46**, 1342(1963)

(1984년 11월 8일 접수)