

## Affinity Chromatography 에 의한 Milk Lipase 의 분리정제와 특성조사

허태련

인하대학교 생물공학과

### A Study on the Characteristics and Purification of Bovine Milk Lipase by Affinity Chromatography

Tae-Ryeon Heo

Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon

#### Abstract

The lipolytic enzyme of milk from hormone treated and non treated cows was isolated and purified. It was shown that the crude lipase extract from the milk before and after a hormone treatment of the cows was different in color, foaming properties, yield and specific activity. Final purification of the lipase system was achieved by affinity chromatography on Heparin-Sephrose CL-6B. The lipase bound by Heparin-Sephrose was then characterised. The pH-optimum of the purified enzyme was 8.5 for butteroil emulsion as a substrate and the optimum temperature was 30°C respectively. The molecular weight, determined by SDS-polyacrylamidegel electrophoresis, was about 70,000. The activity increased by 10% when 0.01% bovine serum albumin was added to the substrate. The results indicate the enzymes obtained by affinity chromatography from milk before and after hormone treatment had the similar characteristics. The second lipolytic active component that was not bound by Heparin-Sephrose must be the cause of spontaneous rancidity.

Key words: milk lipase, affinity chromatography, rancidity

#### 서 론

우유중의 유지방은 착유후에 즉시 냉각하거나 살균하지 않으면 바람직하지 않은 화학적이고 생화학적인 반응을 일으켜 유지방이 변질되어 우유의 향기와 맛에 나쁜 영향을 미친다. 이 산패(Rancidity)는 지방입자가 지방분해 효소인 lipase 의 작용을 받아서 화학적인 변화를 일으킨 결과이며 지방분해 효소가 활성화 되었거나 기질이 쉽게 침해받을 수 있는 상태에서는 더 잘 일어나게 된다. 이러한 지방산패(spontaneous rancidity)는 생유뿐만 아니라 시유에도 일어날 수 있다. 경우에 따라서는 일부 이러한 산패유가 치즈제조용 vat 에 있는 많은 양의 우유에 혼합되었을 때 전체 우유에 산패를 일으켜 막대한 경제적 손실을 가져 오기도 한다. 이와 같은 lipolysis 를 일으키는 경향의 차이는 우유에 있는(혈액에서 나온) 특정한 성분이 milk lipase 를 활성화 시킨다는 보고도 있다<sup>(1,2)</sup>. 젖소의 홀몬 불균형 특히 ovarian cist 에서의 높은 Estrogen 수준이나 hormone 약제의 투여는 산패의 또다른 요인이 될수도 있는 것으로 알려졌다<sup>(3)</sup>. 또한 지방분해 효소의 활성도는 발정기 동안 높다

고 알려졌다<sup>(4)</sup> 이 경우는 특히 ovarian cist 가 존재했을 때 분명하게 나타나며 follicle 홀몬주사를 통해서 우유의 산패발생을 5-7일 동안 일으킬 수도 있다는 보고가 있다<sup>(5)</sup>. Deeth 와 Gerald<sup>(5)</sup>는 대부분의 소는 산유기의 후기에, 몇몇 소들은 산유기의 초기에도 자연산패유(spontaneous rancid milk)를 생산하며 주로 산유말기에 들어서 우유에 lipolysis 가 나타난다고 보고하였다<sup>(6)</sup>. 자동산패에 관련된 유지방 변화의 요인이 lipase system 에 기인한다는 보고는 아직도 미흡한 상태에 있다.

따라서 본 실험에서는 자동산패의 원인이 되는 lipase system 을 조사하기 위해서 실험용 젖소에 홀몬처리를 하여 얻은 우유와 홀몬처리를 하지 않은 젖소에서 얻은 우유에 함유된 lipase 를 친화성 크로마토그래프를 이용하여 분리 정제하여 그 특성을 조사하였다.

#### 재료 및 방법

실험절차에 필요한 실험용 젖소 선택과 홀몬약제 종류의 선택 및 사용방법에 대해서는 이미 보고한 방법<sup>(7)</sup>에 따라 실험하였다. 이에 근거하여 사용한 홀몬은 Estra-

diolbenzoate 이며 젖소의 선택은 4마리로 모두 비슷한 산유기에 있었으며 정상적인 건강상태를 나타내었고 ovarian cyst 는 없었으며 Mastitis test 를 실시하여 이상이 없었다.

### Milk lipase 의 분리

유지방 분해효소의 분리 정제는 2단계로 나누어 실시되었다. 첫 단계에서는 실험 젖소의 혼합우유에서 리파제 추출물을 분리하였다. 이 lipase raw extract 의 생산은 Egelrud 와 Olivecrona<sup>(9)</sup>의 방법에 기초를 두고 그 방법을 약간 변경하여 사용하였다. 정제의 마지막 단계에서는 Heparin Sepharose 를 이용한 친화성 크로마토그래피를 이용하여 첫 단계에서 얻은 추출물에서 lipase 를 분리 정제하였다. Chromatography column 의 크기는 K16×195mm(Sweden) 이었으며 column 안에는 Heparin Sepharose-CL-6B(pharmacia AG, Uppsala)를 buffer I, 완충용액을 사용하여 충전시켰다. 이 column 은 ultrarack II와 uvicord II가 부착된 chromatography system 장치를 사용하였다(LKB, Bromma, Sweden).

실험에 사용된 Gradient 완충용액은 ;

Buffer I : 0.5M NaCl in 0.01M phosphate buffer(pH 7.5) with 30% glycerin,

Buffer II : 1.5M NaCl in 0.01M phosphate buffer(pH 7.5) with 30% glycerin

위 작치는 lipase 가 열에 불안정하므로 8°C의 특수장치하에서 실행되었다. Column 은 완충용액 I 로 씻고 평형을 맞추었다. 3g 의 lipase 추출물을 150ml 의 buffer I 에 녹인후 1시간 정도 4°C의 냉장고에 넣어 두었다. 이어서 1시간 동안 16,300 × g 로 원심분리 하여 녹지 않는 부분을 제거하였다. 상등액을 column 에 주입시켰고 buffer I 으로 흡수되지 않는 동안 단백질을 제거하였다. 유속은 시간당 6-7ml 로 하였다. Heparin 에 결합된 lipase 는 같은 유속으로 0.5-1.5M NaCl 용액으로 분리하였다. Buffer I 과 buffer II 로 gradient 의 혼합액을 만들기 위해 gradient-mixer 를 사용하였으며 eluate 는 fraction collector 로 시간당 흐르는 양을 모았으며 lipase activity 를 다음과 같은 방법으로 측정하였다. 효소 활성도가 있는 fraction 은 모아서 그 다음 실험을 위해 -18°C로 냉각시켜 두었다.

### 효소 활성도 측정

Lipase activity 측정을 위해 사용된 장치는 pH-stat

(Metrohm AG, Impulsomat E 473, Switzerland)이다. 측정을 위해 사용한 용기는 보온 조절이 가능한 것으로 여기에 사용된 기질은 buffer 에서 수분을 제거한 유지방이다. 기질을 에멀전으로 만들기 위해 5g 의 유지방을 95ml gum arabicum 에 섞어 polytron mixer 를 이용하여 5분 동안 에멀전화 시켰으며 불순물과 혼합중에 섞여진 공기를 제거하기 위해 glass wool 을 통하여 과시켰다. 기질의 pH 는 1N NaOH 용액으로 pH 9.0 으로 조절하였고 매 실험마다 새로 만들어 사용하였다. 적절한 기질과 효소의 사용량은 기질 5ml 에 0.5ml 의 효소 함유 용액이다. 효소 추출물 생산과정과 분리 정제 과정에서 활성도 측정은 측정온도 30°C와 최적 pH 는 8.5로 조절하여 사용하였다. 이 조건은 정제된 효소의 최적 온도와 pH 이었기 때문이다. 몇가지의 경우는 specific catalytic activity 치가 주어졌으며 이 값은 측정된 효소 활성도 값을 함유 단백질량으로 나눈 것이다(n Kat/mg protein). 그 외 몇가지 경우는 상대 활성도(relative activity)로 표시했다. 이 계산치는 최적 조건에서 최고의 활성도를 100으로 놓고 백분율로 계산한 값이다.

### 단백질 함량 측정

정제 과정에서 단백질함량은 Lowry<sup>(9)</sup>에 따라 정량하였으며 bovin-serum-albumin 을 표준단백질로 사용하여 표준곡선을 작성하였다.

### 분자량 측정

효소의 정제과정에서 추출물의 순도를 측정하기 위해 polyacrylamide gel 을 사용한 전기영동법을 실시하였다. 정제 효소의 분자량 측정에 있어서도 같은 방법을 사용하였고 전기영동법은 Weber 법<sup>(10)</sup>을 사용하였다.

### 결과 및 고찰

효소 추출물의 제조는 효소가 우유 카제인과 결합되었기 때문에 카제인 추출물에서 용해 분리시켜야 했으며 lipase 를 이 용액으로 용해시키기 위해서는 고농도의 염분 농축용액의 사용이 필요하게 되었다. 리파제가 열에 매우 민감한 것은 알려져 있는 사실이므로 추출 정제과정에서 침전은 주의깊게 해야 했으며 활력의 저하를 방지하기 위해 추출과정에서 중요한 부분을 4°C의 냉장실에서 실행하였다. Egelrud 와 Olivecrona<sup>(11)</sup>는 리파제 추출물의 제조과정에서 효소의 안정성이 떨어짐으로서 응집형성이 생기므로 안정성을 좋게 하기 위해 0.001%(v/v

v)의 2-mercaptoethanol을 첨가할 때 안정성이 향상됨을 보고하였다. 그 이유로 인하여 본 실험에서도 mercaptoethanol을 사용한 결과 효과가 있었다.

리파제 추출물 두가지는 서로 비교되며 몇가지의 차이가 있었다. 홀몬 처리후의 리파제 추출물은 전체 정제과정에서 많은 거품발생을 일으켰다. Jenness와 Patton<sup>(12)</sup>에 의하면 일반적으로 거품의 발생 요소는 자연적인 지방 입자막과 관련이 되었다고 한다. 이와 관련하여 홀몬처리된 소의 젖에 유지방 입자막이 정상적인 우유의 지방 입자막 보다 다른 구를 갖고 있는 것으로 생각된다. 즉 홀몬의 영향을 통하여 유지방 합성 과정에서 불충분하게 형성된 막인지 혹은 이미 손상된 지방구 막인지 의문시되었다.

그 외에도 홀몬처리된 소의 우유에서의 리파제 추출물

은 연한 갈색을 띠었으며 반면에 홀몬처리가 안된 우유에서의 추출물은 흰색임을 보여 주었다. 이 색깔의 차이는 어떠한 동반물질에 기인한다고 할 수 있었다.

Table 1 및 2에서 보듯이 홀몬 처리전의 우유에서 리파제 추출물의 생산량은 홀몬 처리후의 우유에서의 리파제 추출물의 생산량과 비교할 때 3배의 많은 양을 얻었다. 두 종류의 우유의 추출물 특수활성이 보이듯 여러번의 실험결과에서 홀몬 처리후의 추출물 효소활성이 평균적으로 홀몬 처리전 보다 2.5-2.8배 높았다. 이것은 홀몬 처리 이전의 우유에서 리파제 추출물의 제조과정에서 효소의 활성물질이 아닌 단백질과 함께 분리되었다고 생각된다. 홀몬 처리후의 추출물의 더욱 높은 효소활성은 리파제가 더 많이 단백질 내에 함유되었거나 또는 효소활성제(activator)가 함께 추출되었을 가능성을 제외할 수

Table 1. Yields of lipase raw-extracts from bovine milk before hormone treatment

Production-step	Volume & weight (ml or.g)	Activity (n Kat/ml)	Protein (mg/ml)	Specific activity (n Kat/mg)	Total activity (n Kat)	Yields (%)	Purification
Skim milk	32,700 ml	11.67	32.2	0.36	381,609	100	1.00
Filtrate after suspending and centrifuging	27,300 ml	6.40	11.0	0.58	174,720	46	1.61
After dialysis against 0.15M NaCl-solution	3,612 ml	18.74	39.0	0.48	67,689	18	1.33
Lipase raw-extracts	97.05g	7.45**	4.8**	1.56	—*	—*	4.33

\* : Not determined due to bad solubility

\*\* : The dried powder(3g) was extracted what with 0.5M NaCl in 0.01M phosphate-buffer with 30% glycerine pH 7.5 and the suspension was centrifuged at 16,300 x g for 60min. Lipase activity was determined on the clear supernatant.

Table 2. Yields of lipase raw-extracts from the bovine milk after hormone treatment

Production-step	Volume & weight (ml or.g)	Activity (n Kat/ml)	Protein (mg/ml)	Specific activity (n Kat/mg)	Total Activity (n Kat)	Yields (%)	Purification
Skim milk	31,900 ml	8.13	30.73	0.27	259,475	100	1.00
Filtrate after suspending and centrifuging	17,530 ml	5.07	3.0	1.69	88,877	34	6.83
After dialysis against 0.154M NaCl-solution	1,305 ml	13.47	19.5	0.69	17,578	7	2.61
Lipase raw-extracts	29.27 g	18.00	4.15	4.34	—*	—*	16.07

\* : Not determined due to bad solubility

\*\* : The dried powder(3g) was extracted what with 0.5M NaCl in 0.01M phosphate-buffer with 30% glycerine pH 7.5 and the suspension was centrifuged at 16,300 x g for 60min. Lipase activity was determined on the clear supernatant.

없었다.

### 리파제 추출물의 정제

이 두 lipase 추출물은 친화성 크로마토그래프를 이용하여 정제하였다. Fig. 1에 크로마토그램을 나타내었다. 이 추출물의 chromatogramm에 나타난 것과 같이 홀몬 처리전의 우유의 lipase 활성도는 fraction 90에서 가장 높았다. 초기의 fraction 30에 나타난 낮은 효소 활성도는 시료속의 많은 lipase가 Heparin-Sephrose-CL-6B에 결합되는 과정에서 소수 부분이 결합되지 않고 그대로 통과되어 나왔기 때문인 것이다. 홀몬 처리후의 우유에서 얻은 리파제 추출물의 정제에서는 lipase 활성도가 초기 fraction 23까지 아주 높았다. 이와 동시에 NaCl-gradient의 elution한 후에 fraction 80에서 부터 lipolytic active fraction이 나타났는데 이 결과는 홀몬 처리전의 우유에서와 같다. 홀몬 처리전과 후에서 얻은 lipase-rawextract의 친화성 크로마토그래프에 의한 정제과정에서 나타난 분명한 차이점은 초기 fraction 20-30에서 나타났다. 홀몬 처리후 우유에서 얻은 lipase rawextract와 lipase activity는 초기 fraction에서 아주 높았는데 이것은 Heparin-Sephrose-CL-6B에 결합되는 과정에서 많은 양의 lipase가 결합

되지 않고 flution 되었던 결과이다. 이 결과는 Heparin-Sephrose-CL-6B에 결합되지 않은 또 하나의 lipolytic enzyme이 함께 하고 있음을 나타낸다. 이를 확인하기 위하여 결합되지 않은 lipase activity를 함유한 fraction을 모아 재 chromatography시켜 본 결과 초기 1-10 fraction에서 lipase activity가 높았으나 Heparin-Sephrose-CL-6B에 결합되지 않았다. 따라서 Estrogen 홀몬처리를 한 우유에는 정상적인 milk lipase와 다른 lipolytic activity를 가진 enzyme이 분비되었다는 것을 이 실험결과는 나타내 주고 있다. 이와 같은 관계는 자연산패발생 우유에 있어서 두 종류의 리파제가 서로 다른 성질을 갖고 있음을 의미하는 것이다. 이상의 결과에서 Estradiol benjoate으로 소에게 홀몬처리를 통하여 효소 시스템의 변화를 초래하였다는 것을 보여주고 있다.

Affinity chromatography에 흡착된 효소와 흡착되지 않은 효소의 특성 비교는 흡착되지 않은 효소가 강한 lipolytic activity가 있음을 실험 종결 단계에서 발견하였고 재 chromatography시킨 결과 얻은 효소량이 특성을 규명하기에 부족하였으며 또 새로운 정제과정을 거쳐 정제된 효소를 가지고 특성을 규명하기에는 많은 시간을 필요로 하였기 때문에 이 특성 규명은 다음 실험 주제로서도 충분한 가치가 있는 내용이므로 본 실험에서는 생략하였다.

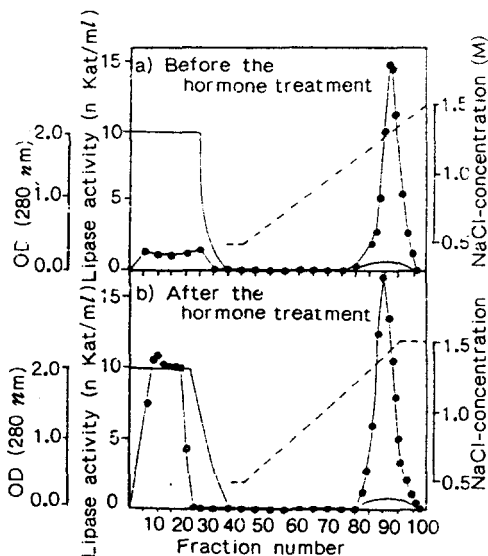


Fig. 1. Heparin-Sephrose affinity-chromatography. (●—●), Lipase activity; (---), NaCl-gradient; (—), OD full scale, 280nm.

### Hormone 처리전과 후에 정제된 lipase의 비교

Affinity chromatography를 통해서 정제된 즉 Heparin-Sephrose-CL-6B에 결합된 리파제는 홀몬 처리를 통해서 어떻게 Enzyme의 성질에 영향을 있었는지의 효소 특성에 관한 성질들을 조사하여 볼 필요가 있어 여러가지 특성을 검토하여 보았다. 효소 활성도에 따른 최적온도의 의존도는 Fig. 2에 나타난 바와 같이 정제 lipase의 최적온도는 30°C이며 두 효소의 이 온도 의존도는 거의 같음을 나타냈다. 2개의 정제된 효소의 활성도에 대한 pH의 영향은 Fig. 3에 나타난 바와 같이 큰 차이를 보여주지 못하고 있다. 정제 리파제의 최적 pH는 8.5 이었다.

위의 실험 결과에서 보여 주는 바와 같이 두 정제된 효소는 분자량이나 pH의 영향, 온도 의존도 또는 여러 종류의 기질에 대한 활성도가 거의 동일시 되었다. 따라서 홀몬처리로서 자연상태의 유지방 분해효소인 lipase는 변화되지 않았다고 할 수 있겠다. 이 리파제에는 홀몬처리된 소에서 얻은 우유에 나타나는 spontaneous ran-

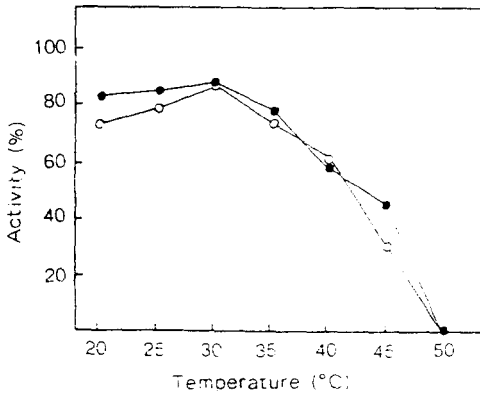


Fig. 2. Temperature-dependence of enzyme activity  
 ○—○; Milk lipase before the hormone-treatment  
 ●—●; Milk lipase after the hormone-treatment

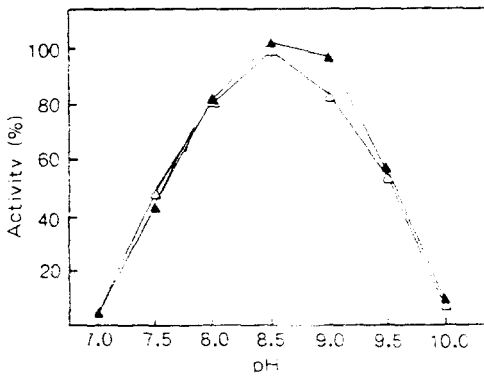


Fig. 3. pH-dependence of enzyme activity.  
 △—△; Milk lipase before the hormone-treatment  
 ▲—▲; Milk lipase after the hormone-treatment

city에 대해서 영향을 크게 미친다고 볼 수 없고 또 Heparin-Sephrose-CL-6B에 잘 결합됨을 볼 수 있었다. 그러나 홀몬처리를 받은 또 다른 우유에서 정제된 lipase는 Heparin-Sephrose-CL-6B에 친화력이 없었다. 따라서 홀몬처리된 소에서 얻은 우유에 나타나는 spontaneous rancidity는 Heparin-Sephrose-CL-6B에 결합되지 않은 lipolytic enzyme에 그 책임이 있다고 할 수 있겠다. 이것은 정상적인 우유에 함유된 milk lipase와는 구별되어야 한다. 위와같은 결과의 이유는 hormone의 불균형 상태로 생유에 자동산패가 나타날 수 있으며 이것은 비정상적으로 분비된 lipase의

출현사이에 연관관계가 있음을 의미하는 것이다.

두 우유에 함유된 고유의 정제된 리파제는 50°C와 pH 8.5에서 7분간 열처리로 불활성 되었다. 조사결과 정제한 우유 리파제의 최대 효소활성은 pH 값이 8.5 이었으며 pH 7.0 아래와 pH 10.0 이상에서 두 정제효소는 거의 효소 활성이 없었고 pH 값의 조사에서도 두 효소는 거의 차이가 없었다. butter oil 이외의 자연적이거나 합성된 기질을 제조하여 두 효소의 활성도를 측정해 본 결과는 Fig. 4와 5에 나타내었으며 상대적인 활성도로 비교해

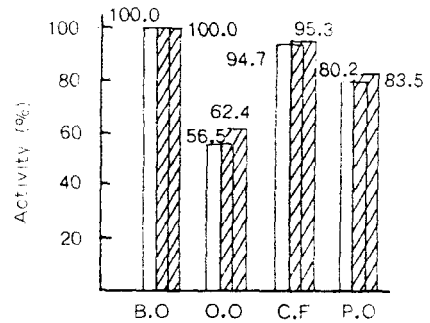


Fig. 4. Enzyme activity with application of four natural substrates.  
 □ Milk lipase before the hormone-treatment  
 ▨ Milk lipase after the hormone-treatment  
 B.O., butter oil; O.O., olive oil; C.F., cocoa fat; P.O., peanut oil.

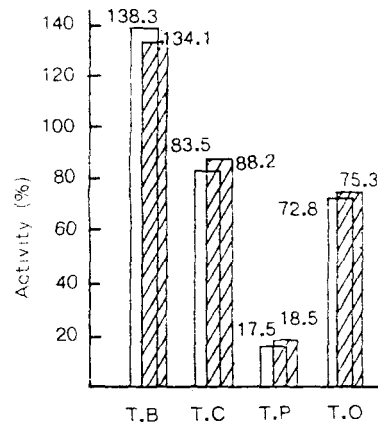


Fig. 5. Enzyme activity with application of four synthetic substrates.  
 □ Milk lipase before the hormone-treatment  
 ▨ Milk lipase after the hormone-treatment  
 T.B., tributyrin; T.C., tricaprin; T.P., tripalmitin; T.O., triolein.

그렸다. 기질로 사용된 트리글리세리드는 tributyrin, tricaprln, tripalmitin, triolein 이었고 자연적인 기질로는 butter oil, olive oil, peanut oil 과 cocoa fat 이었다. 그림에서 알 수 있는 바와 같이 개개의 기질에서 효소활성도의 차이는 눈에 띄게 나타나 있다. Tributyrin 에 대한 효소 활성도는 가장 높았고 tripalmitin 보다는 약 7배 정도 가수 분해도가 높았다. 그 외 자연적인 기질에 대한 효소 활성도는 butter oil 이 가장 높았고 olive oil 이 가장 낮았다. 두 정제 효소에 대한 차이는 거의 나타나지 않았다. 정제된 두 효소의 활성도에 대한 bovine-serum-albumin(BSA)의 enzyme 활성도에 대한 영향은 Fig 6에 나타냈다. 그림 6에서 보듯이 0.01%의 bovine-serum-albumin 의 첨가로 효소활성도는 증가되었다. 이와는 대조적으로 많은 양의 BSA 의 첨가는 lipolysis 에 대한 저해작용으로 나타났다. 이 결과에서 lipase 의 작용으로 나타난 free fatty acid 가 적당량의 BSA 의 첨가로 인해 이 BSA 와 결합됨으로써 결국은 리파제의 작용저해를 없애주는 효과로 나타났다. Fig 7 에서 보는 바와 같이 분자량의 크기는 두 정제된 효소가 거의 같이 70,000 이하로 측정되었다. 분자량도 주 Band 로서 계산되는데 이것은 처리안된 소에서 얻은 우유의 리파제에서 69,700, 또한 홀몬 처리된 우유의 리파제에서 70,000에 달하고 있다. 즉 이 결과는 두 효소가 거의 동일한 분자량을 갖고 있음을 나타내 주고 있는 것이다.

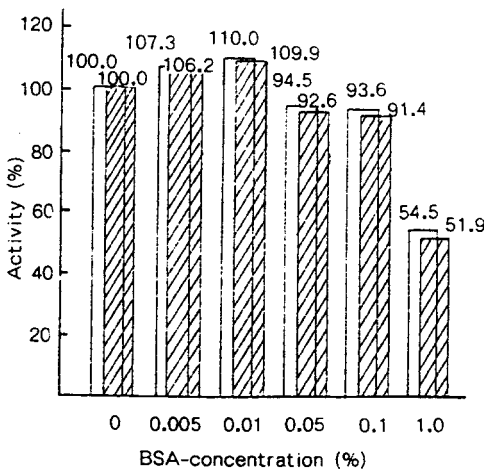


Fig. 6. Effect of bovine serum albumin on the activity of milk lipase.

□ : Milk lipase before the hormone treatment  
 ▨ : Milk lipase after the hormone treatment

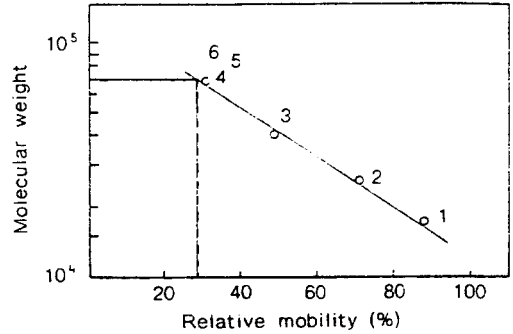


Fig. 7. Determination of molecular weight of milk lipase by electrophoresis.

1, Myoglobin; 2, Chymotrypsinogen A; 3, Aldolase; 4, Bovine serum-albumin; 5, Milk lipase before the hormone treatment; 6, Milk lipase after the hormone treatment.

요 약

우유의 지방분해 효소인 리파제를 분리 연구하기 위하여 홀몬처리 되지 않은 정상유와 홀몬처리된 비정상유에서 리파제를 Heparin-Sephrose-CL-6B 를 이용하여 분리 정제하였다. Heparin-Sephrose 에 친화력을 조사한 결과 두개의 효소활성이 있는 성분이 구분되었으며 한 성분은 Heparin-Sephrose-CL-6B 에 결합되었고 다른 한 성분은 결합되지 않은 채 분리되었다. 친화성 크로마토그램에 결합되어 분리 정제된 리파제의 최적 온도, 최적 pH, 기질 특이성, 분자량 및 BSA 의 활성제로서의 작용등 여러가지 효소특성은 모두 동일한 것으로 나타났다. 그러나 홀몬처리된 소에서 얻은 우유의 경우에는 또 다른 효소활성 성분이 나타나 있음을 알았다. 이 lipolytic activity 가 있는 성분은 Heparin-Sephrose-CL-6B 에 친화력을 보이지 않았으므로 정상적인 milk lipase 와는 구별된다. 따라서 홀몬처리된 소에서 얻은 우유에 함유된 성분중 Heparin-Sephrose 에 결합된 효소는 유지방 자동산화에 영향을 끼치지 않으며 Heparin-Sephrose 에 결합되지 않은 활성이 있는 성분은 자동산패에 영향을 크게 미친다고 볼 수 있다. 그 이유는 hormone 의 불균형 상태로 인하여 생유에 자동산패가 일어날 수 있으며 이것은 비정상적으로 분리된 리파제 출현 사이에 연관관계가 있음을 의미한다.

## 문헌

1. Bachman, M. : Beitrag zur Kenntnis der lipolytischen Fettspaltung in Milch und Kaese. Diss., ETH Nr. 3043(1960)
2. Jellema, A. : Note on susceptibility of bovine milk to lipolysis. *Neth. milk and dairy J.*, **29**, 145(1975)
3. Bachman, M. : Das Problem der Ranzigkeit in Milk und Kaese. *Schweiz Milchzeitung* 87 Nr. 53 Wissenschaftliche Beilage Nr. 79(1961)
4. Baumgartner, H. : Hormonal bedingte Ranzigkeit der Milch. *Schweiz. Arch. f. Tierheilk.*, **106**, 755(1964)
5. Deeth, H.C. and Fitz-Gerald, C.H. : Lipolysis in dairy products. *The Australian J. Dairy Technol.*, **31**, 53(1976)
6. Menger, J.W. : Experience with lipolytic activities in milk and dairy products. *IDF Doc.*, **86**, (1975)
7. 허태련 : 우유의 spontaneous rancidity에 관한 연구. 한국유가공 연구회지, **4**, 20(1985)
8. Egelrud, T. and Olivecrona, T.J. : The purification of a lipoprotein lipase from bovine skim milk. *J. Biol. Chem.*, **247**, 6212(1972)
9. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265(1951)
10. Weber, K., Pringle, T.R. and Osborn, M. : *Measurement of Molecular weights by electrophoresis on SDS-Acrylamide Gel in methods in Enzymology*. Academic Press, New York Vol. **26**, 3(1972)
11. Egelrud, T. and Olivecrona, T. : Purified Bovine milk lipase. *Biochem. Biophys. Acta.*, **306**, 115(1973)
12. Jenness, T. and Patton, S.T. : *Grundzuege der Milchchemie*. Bayrische Landwirtschaftsverlag, Muenchen(1967)

(1988년 5월 6일 접수)