

Geotrichum candidum Lipase의 熱不活性에 關하여

朴 官 和
서울대학교 農科大學 食品工學科
(1977년 2월 28일 受理)

Thermal Inactivation of Lipase from *Geotrichum candidum*

K. H. Park

Dept. of Food Technology, College of Agriculture, Seoul National University
(Received Feb. 28, 1977)

SUMMARY

Lipase from *Geotrichum candidum* was heat inactivated in 0.1M phosphate buffer solution. The thermal inactivation followed first order kinetics for the range of temperatures 50°-80°C except at 50°C.

The changes in enthalpy, entropy and Gibbs free energy at 60°C were 120.4 kJ/mol, 73.0 J/mol · K and 96.9 kJ/mol respectively and the z value of 19°C (*Geotrichum candidum* lipase) is greater than that of lipases from milk and pancreas. The effect of detergents, lecithin and linoleic acid on the thermal inactivation of lipase was found to be negligible.

머 리 말

야채류등의 식품 저장의 전처리로 행하는 데치기 공정 (blanching process)의 처리시간 관점으로 사용되고 있는 peroxidase의 열역학적인 자료에 대하여는 많은 보고가 있는 반면에 식품 저장중 그 품질변화에 큰 영향을 미친다고 생각되는 지방 분해효소의 열 저항성에 대해서는 비교적 많지 않은 보고가 있을 뿐이다.

Hottenroth(1)는 췌장 lipase(pancreas lipase)의 열 불활성을 연구하고 이 효소는 지방의 존재하에 열 저항성이 높다는 것을 보고하였고 Driessen과 Stadhouders(2)는 세균성 lipase의 열 저항성을 관찰하고 Gram-negative 박테리아가 분비하는 효소가 비교적 열 저항성이 높다고 지적하였다. Loncin(3)는 *Geotrichum candidum*으로 감염된 종려 열매를 100°C이상의 온도인 수증기로 처리한 후에

lipase의 잔류활성을 경성적으로 검출하여 *Geotrichum candidum*이 분비하는 lipase의 높은 열 저항성에 대한 가능성을 시사하였다. 위의 곰팡이는 우유등의 식품에 자주 출현하는 것으로 본 실험에서는 위의 lipase를 분리하여 그 열역학적인 성질을 정량적으로 구명하였다. 한편 효소의 열 처리과정에서 처리용액내의 조성 등은 효소의 열 불활성화 성질을 크게 좌우하는 요소로 그 영향력이 상당하다는 것이 알려져 있다. 지금까지 가장 많이 연구된 것으로는 용액의 pH가 효소의 열 불활성화에 미치는 영향이라 하겠는데 이외에도 실제 식품중에 존재하는 다른 물질 특히 녹색 식물중의 지방중 대부분(80%이상)을 차지하고 있는 phospholipid 등은 peroxidase의 경우 그 영향력이 컸다. Park(4)등은 peroxidase의 용액에 lecithin을 가하고 열 처리하여 lecithin의 농도에 따른 영향을 조사하여 보고한 바 있다. 이와같은 현상이 lipase의 경우에

도 일어날 가능성이 있다는 가정 아래 분리한 lipase에 lecithin등을 가하고 열처리하여 보았다.

실험재료 및 방법

1. 실험재료

가) *Geotrichum candidum* lipase의 조효소액 조제

본 실험에 사용한 균주-En 0203-는 Institut für Gärungsgewerbe und Biotechnologie, Technische Universität Berlin에서 분양한 것을 사용하였고 균의 배양은 Alford(5)의 방법에 의하여 행하였다. 배양후 배양액을 여지를 사용하여 여과한 후 여액은 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 사용 0.3~0.6 포화용액 중의 침전을 분취 채취하였다. 침전물을 인산 완충액(pH 7.0)에 녹인 후 다시 아세톤(-50°C)을 가하여 최종 아세톤 함량 75%가 되게하여 침전물을 채취하고 질소 stream을 사용 건조시킨 후에 -25°C저장 사용하였다. 단백질 함량에 대한 효소 역가를 비교하여 약 10배 정도의 높은 순도의 조효소를 얻었다.

나) linoleic acid (>99%)는 Sigma Co.에서 구입 사용하였고 lecithin은 난황 lecithin (Merck, West Germany)을 silicic acid column을 사용하여 정제하였다.

2. 실험방법

가) 효소용액의 열불활성

효소용액의 열 불활성은 Levine의 "flaskmethod"의 원칙을 변조한 방법(4)을 사용하였다.

28ml의 0.1M인산 완충용액을 water bath에서 미리 열처리 온도까지 가열한 다음 2ml의 효소용액을 가하고 자석식 교반기로 격렬히 교반하여 효소용액 온도의 급상승을 얻었고 일정한 시간 후 피펫으로 일정량을 신속히 채취하여 미리 얼음으로 식힌 시험관에 옮겨 용액을 신속히 냉각시켰다.

나) Lipase의 역가 측정

i) 용액의 조제

Hydroxylamine용액: Hydroxylamine-hydrochloride 20g을 220ml의 methanol에 가하여 표준 시약 용액으로 하고 이 용액에 3.5N NaOH를 5:3(Hydroxylamine 용액: NaOH용액)의 비율이 되게 희석하여 사용하였다.

FeCl_3 용액: 100g의 FeCl_3 를 1.2N HCl용액 100 ml에 가하여 표준 시약용액을 조제하고 사용 시에

는 ethanol을 가하여 FeCl_3 표준용액: ethanol=1:4가 되게 희석하여 사용하였다.

기질 유화액: 0.25g triolein, 0.25g arabic gum, 1% NaCl용액 4ml와 0.05M Tris-완충액(pH 8.0) 6ml를 혼합한 용액을 Biosonik III (Bronwill scientific)을 사용하여 ultra sonification시켜 안정한 기질 유화액을 조제하였다.

ii) 측정

lipase의 반응 속도는 hydroxamic acid 변법(6)을 사용하여 측정하였다.

기질 유화액 0.25 ml를 취하여 0.1% deoxycholate 0.1ml와 0.1M CaCl_2 0.1ml와 혼합하여 10ml들이 시험관에 넣은 후 0.1ml 효소액을 가하고 30°C에서 자석식 교반기를 사용하여 교반하면서 60분 동안 반응시켰다. 이 반응액에 2.5ml의 ethanol, 2.5ml diethylether 및 1.0ml hydroxylamine 용액을 가하여 효소반응을 중지시키고 40분 동안 실온에서 방치하여 hydroxamic acid가 충분히 생성되게 한 후 3.3N-HCl 0.45ml와 FeCl_3 용액 0.5ml를 가하여 작용시킨 후 원심분리하여 상등액을 취하고 ZEISS PMQ II를 사용하여 535 nm에서 흡광도를 측정하였다. 반응전과 후에 존재하는 ester 결합의 차이를 효소반응의 속도로 표시하였다.

결 과

열처리 온도 50°~80°C사이에서의 lipase의 열불활성화 곡선은 Fig. 1에 표시한 바와 같다 50°C에서는 일반 다른 효소에서와 마찬가지로 열불활성화 곡선에서 꺾어지는 점을 관찰할 수 있었고 그 이상의 온도에서는 1차반응에 따라 효소의 역가가 열처리 시간에 따라 지수 함수적으로 감소하였다. Fig. 1에서 구한 *D-value의 온도에 대한 영향을 Fig. 2에 표시하였다. Table 1에는 D-value 및 **z-value를 종합하여 적었으며 절대 반응속도 이론에 의거한 열역학적인 값은 Table 2에 수록하였다. Fig. 3 및 Fig. 4는 주어진 온도에서 lecithin과 linoleic acid가 lipase의 열 불활성화에 미치는 영향을 보여주는 것으로 실험 범위 내에서 큰 영향을 미치지 않은 것으로 나타났다. lecithin의 존재하에서 60°C에서 열처리했을 경우 처리시간 10분 이후에는 오히려 보호작용을 하는 결과를 나타내었다.

*) D-value; decimal reduction time, 효소의 역가가 주어진 온도에서 90% 감소하는데 필요한 시간

**) z-value; D-value가 90% 감소하는데 올려주어야 할 온도

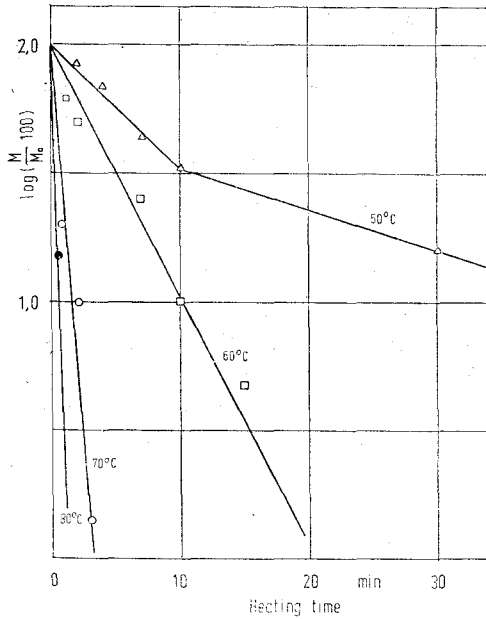


Fig. 1. Thermal inactivation of *Geotrichum candidum* lipase at various temperatures in 0.1M phosphate buffer pH 7.0. Enzyme concentration 2mg/ml. M_0 : enzyme activity at heating time zero, M : enzyme activity at heating time t .

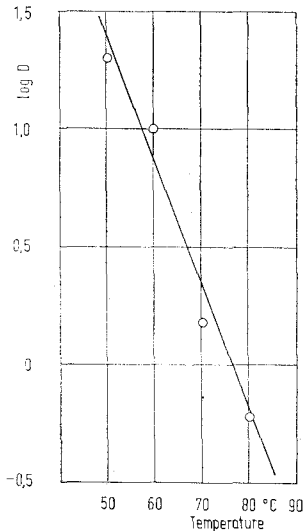


Fig. 2. Inactivation rate of *Geotrichum candidum* lipase as a function of temperature. Enzyme concentration 2mg/ml. pH 7.0.

Table 1. First order reaction rate constants and D values for inactivation of *Geotrichum candidum* lipase.

Temperature (°C)	Rate constant, k ($s^{-1} \cdot 10^{-3}$)	D value (s)
50	1.92	1200
60	3.62	636
70	25.6	90
80	64.0	36

z -value..... 19°C

Table 2. Thermodynamic constants for inactivation of lipase from *Geotrichum candidum*

Temperature (°C)	ΔH^\ddagger (kJ/mol)	ΔG^\ddagger (kJ/mol)	ΔS^\ddagger (J/mol.K)
60	120.4	96.9	73.0

ΔH^\ddagger = enthalpy of activation

ΔG^\ddagger = Gibbs free energy of activation

ΔS^\ddagger = entropy of activation

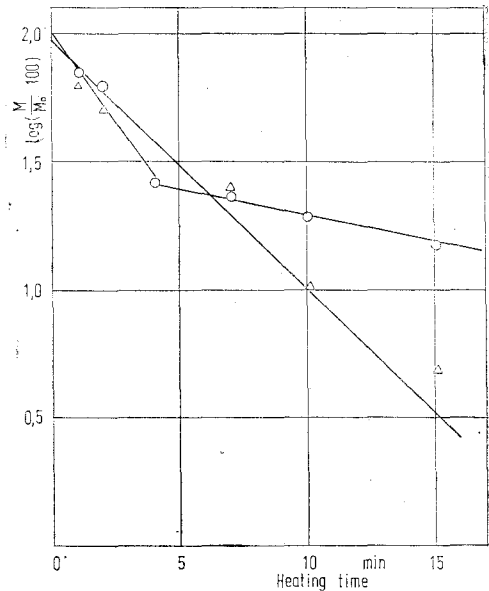


Fig. 3. Influence of lecithin on the thermal inactivation of lipase from *Geotrichum candidum* at 60°C. Δ heated in the absence of lecithin, \circ heated in the presence of lecithin. lecithin concentration 30 μ M.

II 활

Geotrichum candidum lipase는 z -value 19°C로서 지금까지 문헌에 보고된 바 있는 pancreas lipase의 경우 3.5°C, milk lipase는 5.5°C (1)의 경우보다 훨씬 높은 값을 보이고 있다. 이는 Loncin(3)

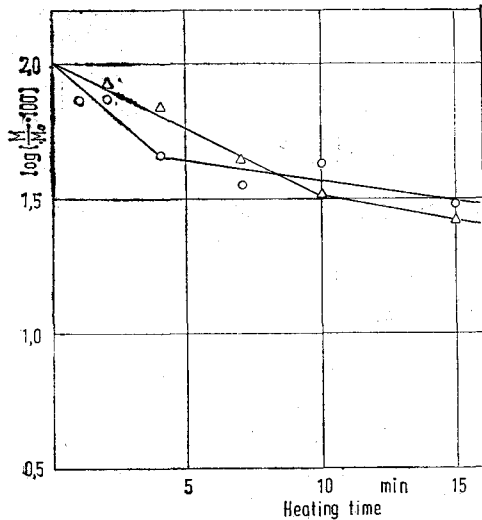


Fig. 4. Influence of linoleic acid on the thermal inactivation of lipase from *Geotrichum candidum* at 50°C. Δ heated in the absence of linoleic acid, \circ heated in the presence of linoleic acid. linoleic acid concentration 100 μ M.

에 의하여 정성적인 실험을 통하여 *Geotrichum candidum* lipase의 열 저항성이 높을 것이라는 사실과 잘 일치하고 있다. *Pseudomonas fluorescens*가 분비한 lipase는 아주 높은 열저항성 ($D_{130^\circ\text{C}}=16$ min.)을 가지고 있다는 보고(2)가 있으나 이는 실험치의 계산중 Fig. 1의 50°C에서 볼수있는 바와 같은 꺾어지는 점 이후의 비교적 느린 불활성화부분을 취한 것으로 초기 부분의 불활성화 속도를 취한 본 실험의 자료와는 비교할 수 없는 것이다. *Geotrichum candidum*이 분비하는 lipase의 z-value가 크다는 것은 lipase의 불활성화가 온도에 대해 예민하지는 않다는 것을 의미하며 이는 고온으로 갈수록 상대적으로 단시간 처리하여 미생물 포자를 살균하게 되는데 이러한 고온에서의 열처리에서 효소가 완전히 불활성화되지 않은 채 식품중에 남아 있게 될 가능성을 시사하고 있는 것이다.

lipase가 식품의 품질에 영향을 미치는 예로는 우유 및 지방성 식품의 산패를 들 수가 있겠는데 그 작용 기작 중의 한가지 예로 만약 lipase가 triglyceride에 작용하여 이들 지방산을 유리 상태로 분리시켜 준다면 lipoxygenase의 작용은 triglyceride에 부착된 지방산을 기질로 할때 보다 더 활발하여 lipoperoxide의 생성 속도가 증가될 것이다, 일반식품을 비롯하여 자연계에 존재하는 유리상태의 지방산이 아주 미량인 점으로 볼 때 lipase의 작용

은 lipoxygenase와 유기적으로 작용하여 식품 품질에 큰 영향을 미친다고 하겠다.

특히 lipase는 건조 식품($a_w < 0.3$ 부근)에서도 활동을 계속하고 냉동식품 (-20°C 부근)에서도 작용을 계속하는 것으로 알려져 있어 식품저장을 위해 미리 열불활성화 시키는 것이 필요하다고 생각된다. Fig. 3과 Fig. 4에서 보는 바와같이 lecithin 및 linoleic acid는 peroxidase 및 lipoxygenase에서와는 달리 lipase의 열 불활성에 별 영향을 미치지 않고 있다. lecithin 및 linoleic acid의 열처리 용액에서의 농도는 peroxidase와 lipoxygenase에서 충분한 영향력을 미치는 농도를 택하여 실험하여 타 효소와 정성적인 비교를 할 목적으로 단일 농도에서 실험하였으나 위의 두계면 활성제의 농도를 변화시켜 그 영향을 살펴보는 것도 남은 과제이라 하겠다.

요 약

*Geotrichum candidum*이 분비한 lipase를 인산완충용액 중에서 열처리하여 열불활성 곡선을 얻었다. 50°C에서 lipase의 열 불활성 곡선은 고온의 경우와는 달리 일차 반응 속도법칙을 따르지 않았고 고온의 경우에는 일차 반응을 따랐다. 60°C에서의 엔탈피, 엔트로피 및 깃스 자유 에너지의 변화는 각각 120.4 kJ/mol, 73.0 J/mol.K 및 96.9 kJ/mol이었다. 열 불활성 곡선에서 얻은 *Geotrichum candidum* lipase의 z-value는 19°C로 pancreas나 우유 중에 존재하는 lipase의 z-value보다 훨씬 큰 값을 나타냈다. 환경인자의 영향으로는 lecithin과 linoleic acid를 첨가하여 열처리 하였는데 실험에 사용한 계면활성제의 농도에서는 별다른 큰 영향을 미치지 않았다.

참 고 문 헌

1. Hottenroth, B.: Die Fleischwirtschaft 54 1071 (1974).
2. Driessen, F.M. and Stadhouders, J.: J. officiel orgaan, Koninklijke Nederlandse Zuivelbond 65 949 (1973).
3. Loncin, M.: personal communication.
4. Park, K.H.: Dissertation, Univ. Karlsruhe (1976).
5. Alford, J.A. and Smith, J.L.: J. Am Oil Chemists' Soc. 42, 1038 (1965).
6. Park, K.H., Duden, R. and Fricker A.: Z. Lebensm. Unters.-Forsch. 157, 327 (1975).