

미강 Lipase 의 효소 화학적 성질에 대한 연구

*최 미 자·이 귀 주

*계명대학교 가정과·고려대학교 가정교육과

Studies on the Enzymatic Properties of Rice Bran Lipase

*Mi Ja Choi, Gui Ju Lee

*Dept. Home Economics, Gradnate School, Keimyung University, Daegu

Dept. Home Economics, Korea University, Seoul

=ABSTRACT=

Some enzymatic properties of the lipase extracted from rice bran were studied. The rate of free fatty acid formation as a function of incubation time was maximum after 30 min. at 35°C. The activation energy of the enzyme was 1.83 Kcal/mol and using a olive oil emulsion as substrate, the Km value was 0.8×10^{-3} M. The enzyme activity was more stimulated by calcium ion. Application of these enzymatic properties onto the effective utilization of rice bran and preservation of rice were discussed.

서 론

식물성 lipase 에 관해서는 효소 단백질이 세포내의 기관들과 결합한 상태로 존재하므로 효소 단백질의 용해가 용이하지 않아 잘 연구가 되어 있지 않았으나 1890년 Green¹⁾이 피마자에서 lipase 가 존재한다는 사실을 발견한 이래 여러 식물 조직으로부터 lipase 활성이 보고 되었으며²⁾ 피마자 lipase 는 그의 높은 활성으로 인하여 식물성 lipase 가운데 가장 많이 연구되어져 왔다³⁾⁴⁾⁵⁾. 또한 비교적 활성이 있는 oil seeds 에서 발아동안에 lipase 활성이 많이 증가한다는 사실이 알려졌는데 이것은 식물이 발아 초기에 지질을 많이 요구한다는 사실을 알수 있어 생리적으로 중요하다⁶⁾. 미강은 쌀을 도정할 때 얻어지는 부산물로서 쌀의 배유에 있어서 보다 단백질과 지방의 양이 높으므로 이들의 이용은 바

람직한 일이다. 즉 미강으로부터 기름을 추출하여 식용유로서 사용하거나 탈지된 미강은 사료로서 사용되어 왔으며⁷⁾ 특히 미강 단백질은 쌀의 배유에 있어서 보다 그의 아미노산 조성에 있어서 lysine 함량이 우수하므로⁸⁾ 미강으로부터 농축 단백질의 추출 및 그의 이용은 쌀을 주식으로 하는 나라에 있어서 매우 가치있는 일이라 하겠다⁹⁾. 그러나 미강내에 존재하는 내재성 지방질 분해 효소들, 예를들어 lipase, lipoxygenase 에 의하여 이와 같은 미강의 이용은 저해되고 있으므로 상당한 경제적 손실을 초래 하고있다¹⁰⁾. 또한 이들 효소는 쌀의 저장시 쌀의 품질 저하에도 관여하여 쌀의 조리시 쌀의 팽윤도를 감소시키고 견고도를 높인다는 연구가 보고되었다¹¹⁾. 따라서 미강층에 존재하는 지방질 분해 효소에 대한 조절은 미강 및 쌀의 품질 저하를 방지하고 그들의 이용도를 증가시킬 수 있다는 견지에서 본 연구에서는 미강 지질의 제 1 대사 과정에 관여하는

미강 lipase 에 대한 몇가지 효소 화학적 성질을 연구 하였기에 이를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

재 료

시료 미강은 밀알 15호를 도정하는 과정에서 얻어졌 으며 얼는 즉시 -10°C 에서 저장하였다. 기질은 olive oil(POMEPEIAN olive oil)을 사용하였으며, 단백질 정량을 위한 bovine serum albumin 은 동경 화성 공업 주식회사제를 탈지 미강 제조를 위한 Acetone 은 Fisher Scientific Co. 제를 기타 본 실험에 사용된 화학 약품 들은 분석용을 사용하였다.

기질의 제조

Olive oil 35g 과 얼음 50g, 그리고 gum arabic(10% 용액) 200ml를 함께 Mixer에 넣고 마쇄함으로써 유 화시켰으며, 이때 얼음은 Mixer에서 나는 열을 방지 하기 위하여 증류수 대신 사용하였고 기질의 변성을 방 지하기 위하여 15초 간격으로 유화시켜 전체시간은 2 분이 되게하였다. 이렇게 해서 얻어진 기질용액은 4°C 에서 보관하면서 사용하였으며, 이때 기질의 농도는 0.348 Mol 이었다.

효소 활성도의 측정

효소 반응액은 0.01M -Tris 용액(pH 9.0), CaCl_2 용 액(1mM), 기질용액 및 일정량의 효소액으로 구성되었 으며, 최종 부피는 증류수로서 총 1ml가 되게끔 보정 하여 35°C 에서 30분간 반응시킨 후 Ethanol을 첨가 하여 반응을 종결시켰다. 생성된 유리 지방산은 phenolphthalein 의 존재하에서 알칼성 0.01N -KOH 용액으 로 중화 적정하였으며, 동일 조건하에서 효소액 대신 증류수를 사용하여 Control 실험을 행하였다. 효소 단 위는 효소액 1ml 당 1분간에 $10\mu\text{mol}$ 의 유리 지방산을 생성하는 것을 1단위로 하였으며¹²⁾, 낮은 효소 활성으 로 인하여 모든 효소활성은 30분에 대한 실험 수치로 표시하였다.

조효소액 추출

신선한 미강(150g)을 Acetone(150ml)과 함께 Mortar에서 마쇄하여 5분간 방치한 후 $10,000\times\text{g}$ 에서 30분간 원심 분리하여 상등액을 제거하였다. 상기 조작을 두 번 더 행하여서 탈지시킨 미강은 Acetone 이 충분히 증 발될 때까지 완전히 실온에서 건조시켰으며 이렇게 해 서 얻어진 탈지 미강(100g)을 500ml의 인산 완충 용 액(0.05M , pH 7.5)과 함께 4°C 에서 12시간 침지 시

킨 후 단백질의 용해도를 높이기 위하여 현탁액을 4°C 에서 60분간 초음파로 처리하였다($1200, 60\text{Hz}, 5\text{A}$). 현탁액은 cheese cloth 로 압착한 후 혼탁한 용액을 $10,000\times\text{g}$ 에서 30분간 원심 분리시킨 후 상등액을 분 말 유산 암모늄으로 60%까지 포화시키고 4°C 에서 4시간 방치시켜 단백질을 침전 농축시킨 후 $17,000\times\text{g}$ 에서 20분간 원심 분리하고 그 침전물을 소량의 증류 수에 용해시켰다. 그리고 유산 암모늄을 제거하기 위 하여 4°C 에서 36시간 Tris-HCl 용액(0.01M , pH 9.0)에 대하여 투석시킨 후 $17,000\times\text{g}$ 에서 20분동안 원심 분리하였고 이때 얻어진 맑은 상등액을 조효소액(crude enzyme)이라하고 crude extract 보다 두배의 활성도를 가지며 여러가지 효소 화학적 성질을 알아 보는데 사 용되었다.

단백질 정량

Bovine serum albumin 을 standard 로 하여 Lowry방 법을 사용하였다¹³⁾.

결과 및 고찰

a. 효소농도와 반응속도

효소의 농도변화에 따른 미강 lipase 의 초기반응 속 도를 측정한 결과 Fig. 1에서 보는 바와 같이 효소농도 와 효소 활성도 사이에 비례관계를 볼 수 있었으며 따 라서 이 반응은 효소 반응으로 간주할 수 있었다.

b. 반응시간 경과에 따른 유리 지방산의 생성율

반응시간 경과에 따른 유리 지방산의 생성율은 30분 에서 가장 높은 생성율을 보였으며, 40분 이상에서는 유리 지방산의 생성은 증가하지 않았으므로 본 실험에 서는 효소반응 시간을 30분으로 하였다(Fig. 2). Bolling 들¹¹⁾에 의하면 쌀을 장기간 저장하였을때 이와 같은 lipase 작용에 의하여 생성된 유리 지방산은 Amylose 와 결합하여 복합체를 형성함으로써 쌀의 견고도를 높 인다거나 혹은 더욱 산화되어 과산화물을 형성하고 후 자는 단백질과 결합함으로써 단백질의 용해도를 감소 시킨다고 보고하였다.

c. 최적온도 및 온도에 대한 안정성

온도에 대한 영향을 본 결과 효소 활성을 위한 최적 온도는 35°C 였다. Pancholy 들¹⁴⁾에 의하면 wheat germ lipase 에 대한 최적온도는 30°C 로 보고하고 있 으며, maize root lipase 에 대한 최적온도는 55°C 로 보고하였다¹⁵⁾. 또한 미강 lipase 의 온도변화에 따른 효 소활성을 Arrhenius 방정식에 따라 표시한 결과는 Fig.

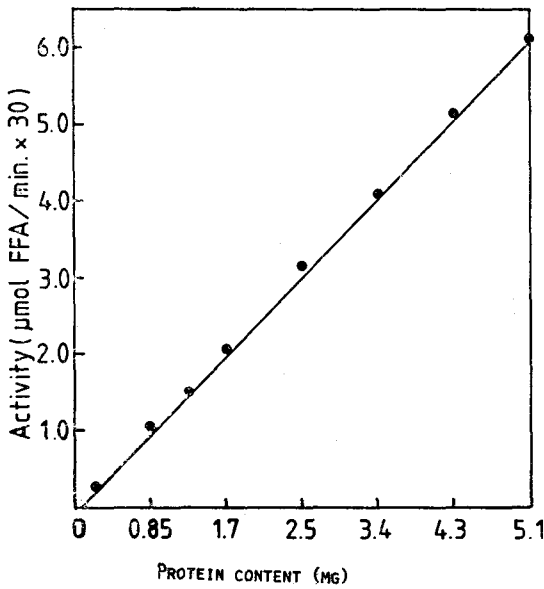


Fig. 1. Enzyme activity as a function of protein content.

3과 같으며 곡선의 직선부분으로부터 활성과 에너지를 계산한 결과 미강 lipase 에 대한 활성화 에너지는 1.83 Kcal/mole 이었다. 미강 지방질 가수분해 효소의 활성화 에너지는 미강 지방질 산화·환원 효소에 대한 활성화 에너지(4.2Kcal/mole)보다 훨씬 낮았으며¹⁰⁾ 실제

로 쌀 및 미강에 있어서 품질저하의 첫단계는 지방질 가수분해 작용에 의한다고 생각된다. 한편 효소액을 Tris-HCl 용액(0.01M, pH 9.0)과 함께 여러 온도에서 10분간 유지시킨 후 잔여 효소활성을 측정할 결과는 Fig. 4와 같다. 미강으로부터 추출한 lipase 는 50°C까지는 비교적 안정하였으나 55°C에서는 40%까지 효소활성이 실패되었으며, 70°C에서는 완전 실패되었다. Ory¹¹⁾에 의하면 피마자로부터 분리한 acid lipase 는 비교적 열에 안정하여 60°C에서는 30분 동안이나 대부분의 효소활성을 유지하며, 98°C에서는 5분후에 거의 실패되었다고 보고하였다. 또한 미강 lipase 에 대한 최적 온도는 2°C에서 저장된 쌀에, 비교하였을때 35°C에서 1년간 저장된 쌀에 있어서 황변이 더욱 현저하였다는 사실과 일치하며 이것은 환원당과 단백질 혹은 lipase 의 작용에 의하여 생성된 유리 지방산의 산화물과의 반응에 의한 비효소적 갈변 반응에 의한 것으로 생각되고 있다⁷⁾. 한편 Shaheen 들¹⁰⁾에 의하면 쌀을 Parboiling 함으로써 lipase 가 불활성화되어, parboiled rice 로부터 얻어진 미강 혹은 미강유에 있어서 지방산의 생성은 저해되며 이후, 아주 느린 속도로 진행되는 지방질의 가수분해 작용은 비효소적 반응에 의한다고 보고하고 있다.

반면, Parboiled rice 로부터 얻어진 이들 부산물들은 비교적 산화되기 쉬운데 이것은 Parboiling 처리를 함으로써 항산화제가 파괴되었기 때문이라고 생각되어진다.

d. 기질농도와 반응속도

일정한 효소농도에서 기질의 농도를 변화시켜 미강

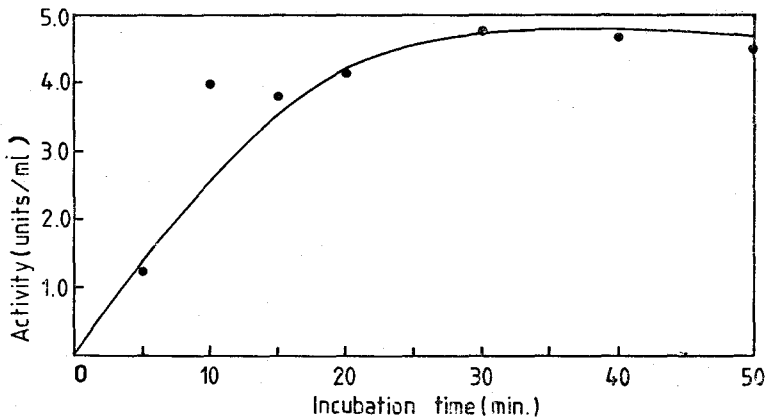


Fig. 2. Enzyme activity as a function of incubation time.

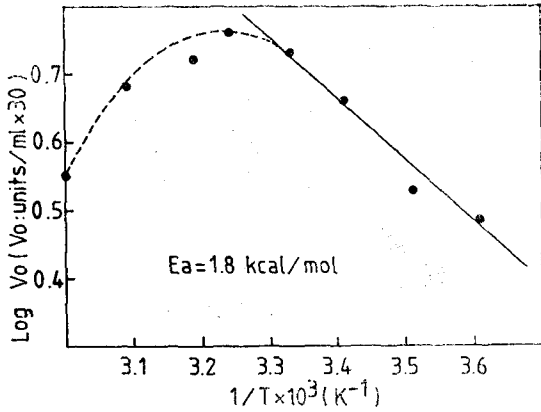


Fig. 3. Arrhenius plot on temperature effect.

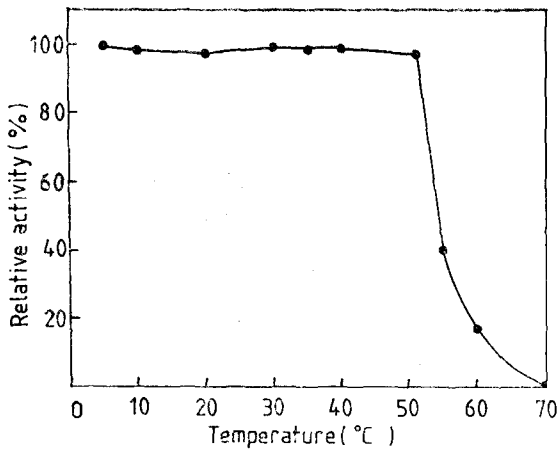


Fig. 4. Temperature stability of lipase from rice bran (stability condition: 10 min. preincubation at various temperature).

lipase에 의한 초기 분해속도를 측정하고 기질농도와 의 관계를 Lineweaver-Burk 식에 의하여 표시한 결과는 Fig. 5와 같다. 또한 이 그래프로부터 최대속도의 절반에 이르는 기질의 농도(K_m 값)를 계산한 결과 $0.8 \times 10^{-3}M$ 이었다. 본 실험에서 약 80%의 triolein 함량을 갖는 olive oil emulsion을 기질로 하였을 때 얻어진 K_m 값을 비교적 탄소수가 적은 지방산과의 에스테르를 기질로 사용한 다른 식물성 lipases의 K_m 값들과 비

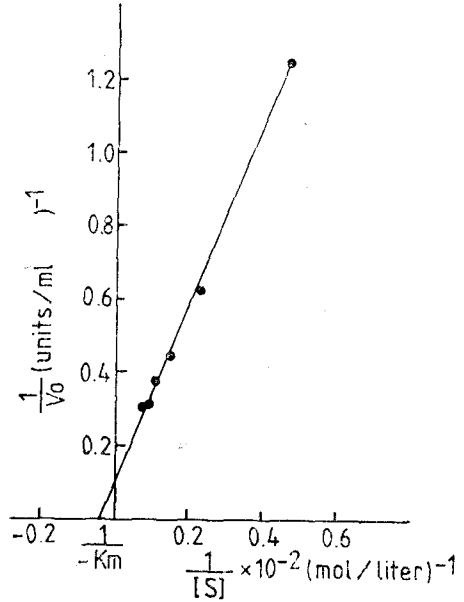


Fig. 5. Lineweaver-burk plot on the variation of substrate concentration

교할 때 기질에 대한 친화력이 비교적 낮았다. 즉 wheat germ lipase에 대한 K_m 값은 $0.03 \times 10^{-3}M$ 로 보고하고 있으며¹⁴⁾ Castor bean endosperm으로 부터는 최적 pH가 다른 2개의 lipases 즉 acid lipase와 alkaline lipase의 존재를 발견하였는데 각각에 대한 K_m 값은 $1.67 \times 10^{-3}M$ 및 $0.23 \times 10^{-3}M$ 이었다⁶⁾.

e. 금속이온의 영향

효소액에 여러 종류의 금속이온들을 그의 최종농도가 $10^{-3}M$ 이 되게 첨가하여 35°C에서 10분간 유지시킨 후 효소 활성을 측정한 결과는 Table 1과 같다. 미강 lipase는 Ca^{++} , Fe^{++} 이온들에 의해서 효소활성이 촉진되는 반면, 다른 금속이온들에 의해서는 다소 차이는 있으나 별로 영향이 없었다. Sunil 등¹⁴⁾은 wheat germ lipase에 대한 금속이온의 영향을 연구한 결과 $10^{-1}M$ 농도에서 Ca^{++} , Mg^{++} 이 활성제로 작용하였다고 보고하였으며, maize root lipase는 $5 \times 10^{-3}M$ 농도에서 Ca^{++} 이온에 의해 저해되었다고 보고하였다¹⁵⁾. 이와 같이 식물성 lipase에 대한 금속이온들의 농도의 차이에 따른 효과는 서로 달랐으므로 보다 상세한 연구가 필요할 것으로 생각되어 진다.

Table 1. Effect of various metal ions on enzyme activity

Metal ions($10^{-3}M$)	Relative activity(%)
None	100
Ca ⁺⁺	161
Cu ⁺⁺	112
Fe ⁺⁺	136
Na ⁺⁺	103
Mg ⁺⁺	98

Enzyme was preincubated with various effectors for 10 min. at 35°C.

요 약

미강으로부터 추출한 lipase의 몇가지 효소 화학적 성질을 알아 보았다. 반응시간에 따른 유리 지방산의 생성율은 35°C에서 30분후에 가장 높았다. 효소의 활성화 에너지는 1.83Kcal/mole이었으며, olive oil emulsion을 기질로 사용하였을때 Km 값은 $0.8 \times 10^{-3} \text{mol/l}$ 였다. 효소 활성은 Ca⁺⁺이온에 의해 보다 촉진되었다. 미강의 효율적 이용 및 쌀의 저장에 대한 이들 효소 화학적 성질의 응용성이 토의 되었다.

참 고 문 헌

- 1) Green J.R.: *Pro. Roy. Soc. London*, 48 : 370, 1980.
- 2) Alchtar M.W. et al.: *Lipase activity in plant seeds. J. Biochem.* 8 : 77-82, 1975.
- 3) Ory R.L. et al.: *Castor bean lipase: Role of the lipid cofactor, Canad. J. Biochem.* 45 : 1445-1450, 1967.
- 4) Ory R. L.: *Acid lipase of the castor bean. Lipides.* 4 : 177-185, 1969.

- 5) Noma A. and Borgström B.: *The acid lipase of the castor beans: Positional specificity and reaction mechanism. Biochem. Biophys. Acta.* 227 : 106-115, 1971.
- 6) Muto S. and Beevers H.: *Lipase activities in castor bean endosperm during germination. Plant physiol.* 54 : 23-28, 1974.
- 7) Houston D.F.: *Rice chemistry and technology.* 285-300, 1972.
- 8) Houston D.F. et al: *Amino acid composition of rice and rice byproducts. Cereal Chem.* 48 : 527, 1969.
- 9) Chen L. and Houston D.F.: *Solubilization and recovery of protein from defatted rice bran. Cereal Chem.* 47 : 72-79, 1970.
- 10) Shaheen A.B. et al.: *Effect of parboiling of rice on the rate of lipid hydrolysis and deterioration of rice bran. Cereal Chem.* 52 : 1-8, 1975.
- 11) Bolling H. et al: *Studies on storage of milled rice for a long period. J. Food Chem.* 3 : 17-22, 1978.
- 12) Sarda L. et al: *Action de la lipase pancreatique sur les esters en emulsion.* 30 : 513-521, 1978.
- 13) Lowry, O.H. et al.: *Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem.* 193 : 265, 1951.
- 14) Pancholy S.K. and Lynd J.O.: *Characterization of wheat germ lipase. Phytochemistry.* 11 : 643-645, 1972.
- 15) Heimann-Mantile J. and Pilet P.E.: *Lipase activity in growing roots of Zea Mays. Plant Science Letters.* 9 : 247-252, 1977.
- 16) Doek Young J.: *Studies on rice bran lipoxxygenase.* 한국과학원 생물공학과 석사논문, 1981.