

흡착법에 의한 Lipase의 고정화

박종학 · 이영춘

중앙대학교 식품가공학과

Studies on the Immobilization of Lipase by Adsorption Method

Jong-Hack Park and Young-Chun Lee

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

Abstract

To utilize lipase obtained from *Candida cylindracea* for lipid hydrolysis, methods to immobilize lipase by adsorption and reaction characteristics of the immobilized lipase by adsorption were investigated. Among the tested adsorbents, silica gel was selected as a suitable adsorbent. The optimum condition for adsorption of lipase was when 47.5 units of lipase were adsorbed to 1.6g of silica gel at pH7.0 and 5°C for 100 min. Optimum pH and temperature for activity of the immobilized lipase were at 37°C and pH7.0, which were same as the soluble lipase. Optimum enzyme concentration of the immobilized lipase were 30g for milk fat and 80g for olive oil, whereas those of the soluble lipase were 800 units for milk fat and 1200 units for olive oil. The optimum substrate concentrations of the immobilized and soluble lipases were 20% lipid, regardless of lipid types. Rapid hydrolysis of milk fat was observed with the soluble lipase for the initial 4 hours and with the immobilized lipase for the initial 8 hours. The immobilized lipase produced same amount of capric acid as the soluble lipase, but more myristic acid and less butyric acid than the soluble lipase.

서 론

Lipase(EC 3, 1, 1, 3)⁽¹⁾는 일반적으로 triglyceride의 ester결합을 가수분해하는 효소로서 식품공업, 세제공업, 피혁공업 및 의약품공업등에 많이 이용⁽²⁾되고 있으며, 특히 식품공업에서는 유제품 flavor의 증진,⁽³⁾ alcohol음료의 flavor개선,⁽⁴⁾ 난 백의 whipping quaity의 개선⁽⁵⁾등에 이용되고 있다. 이와같은 lipase의 이용은 다른 효소들과 마찬가지로 고정화 효소의 이용이 그의 경제성 및 반응효율성에 있어서 유리하여 ion exchange resin⁽⁶⁾, siliconized glass beads⁽⁷⁾, polyacrylamide^(8,9), stainless steel beads⁽¹⁰⁾, collagen membrane⁽¹¹⁾등을 담체로 하여 고정화가 행해졌다.

본 연구에서는 *Candida cylindracea*에서 추출된 lipase를 흡착법에 의해 고정화하고 이것을 유지분해에 이용하기 위한 기초연구로서 유지방 및 올리브유에 대한 가용성 및 고정화 효소의 반응특이성을 조사하였다.

재료 및 방법

재료

효소 : Lipase는 *Candida cylindracea*에서 추출된 것을 Sigma chemical Co.(U.S.A.)에서 구입하여 사용하였다.

담체 : 담체로는 흡착능력을 가지고 있는 kaolin, active carbon, avicel 및 silica gel을 105~110°C에서 30분 건조후 desiccator에 보관하여 사용하였다.

기질 : 가용성 및 고정화 효소의 기질로는 유지방과 올리브유를 이용하였다.

효소의 활성측정

가용성 및 고정화 효소의 활성측정은 Yamada등⁽¹¹⁾의 PVA(poly vinyl alcohol)-Olive oil emulsified system에 의하였으며 효소의 1단위는 1분간에 1 μ M의 지방산을 유리하는 양으로 하였다.

효소의 고정화

담체를 선택하기 위하여 담체 1g에 대해 pH 7.0의 효소액 10 ml(4.75 units/ml)를 가하고 5°C에서 1시간 진탕혼합한 후 3000~rpm에서 10분간 원심분리하였다. 흡착된 효소의 활성은 상법에 의해 측정하여 각 담체간의 활성을 비교하였다.

선정된 가장 우수한 담체 1g에 효소액(4.75 units/ml) 10 ml를 가하여 5°C에서 1시간 진탕한 후 3000~rpm에서 10분간 원심분리하고 흡착 잔존액의 활성을 측정하여 흡착률이 가장 높은 시간을 흡착시간으로 정하였다.

담체량의 선정은 담체량을 달리하면서 앞의 방법과 같이 효소액을 흡착시켜 흡착률이 가장 높을 때의 양으로 결정하였다.

고정화 효소의 성질

고정화 효소와 가용성 효소의 성질을 조사하기 위하여 기질로 올리고뉴와 유지방을 사용하여 비교하였다. 최저온도는 각각의 온도에 따른 활성을 측정하여 활성이 가장 높은 온도로 결정하였다. 그리고 최적pH는 각각의 pH에 따른 활성을 측정하여 활성이 가장 높은 pH로 하였다.

고정화 효소의 열안정성을 조사하기 위하여 10~75°C의 온도에서 12시간 방치한 후 그 잔존여가를 조사하였다. 그리고 고정화 효소의 pH를 4~10(pH 4.0~8.0은 McIlvaine buffer, pH 8.0~10.0은 Mengel buffer를 사용)로 조정하고 5°C에서 12시간 방치한 다음 그 잔존여가를 측정하여 고정화 효소의 pH안정성을 조사하였다.

고정화 효소의 유지방 및 올리고뉴에 대한 적정효소농도의 설정은 기질을 지방함량 20%, pH 7.0로 조절한 후 기질 30ml에 대하여 효소농도를 달리하면서 초기반응속도를 측정하고, 초기반응속도가 효소농도에 의해 거의 영향을 받지 않는 점으로 하였다. 그리고 적정기질농도는 지방함량을 달리하면서 최적효소농도에서 반응시켜 초기반응속도를 측정하고, 초기반응속도가 기질농도에 의해 거의 영향을 받지 않는 점으로 하였다.

고정화 효소에 의한 지방 가수분해

고정화 효소의 반응시간에 따른 지방 가수분해를 보기 위하여 반응 최적조건에서 500 rpm으로 교반하면서 반응시켜, 일정시간 간격으로 10 ml씩 반응액을 취하여 acetone-ethanol동량혼합액 20 ml를 가해 효소를 불활성화 시킨 다음 0.05 N-NaOH로 적정하여 지방산의 가수분해 속도를 측정하였다. 또한 반응시간에 따라 생성된 유리지방산의 profile을 Bills⁽¹³⁾의 방법을 응용하여 HPLC(Varian, 5000 Liqid Chromatography)로 분석하였다.

결과 및 고찰

효소의 고정화

담체의 선택 : 흡착법으로 lipase를 고정화하는데 적합하다고 여겨지는 담체 5종을 선정하여 흡착물과 효소활성을 조사한 결과는 표 1과 같다. 흡착물에서는 kaoline이 97.4%로 가장 높게 나타났으나, 그의 활성은 다른 흡착체에 비하여 낮게 나타났다. Silica gel의 경우 입자가 작은 것이 높은 흡착률을 나타냈고 활성도 높았다. 본 연구에서는 흡착률과 활성이 높은 silica gel(70~230 mesh)을 고정화 효소의 담체로 선정하였다.

흡착시간 및 담체량 : Silica gel에 대한 lipase의 흡착시간을 조사한 결과는 그림 1과 같다. 흡착시간 10분에 약 67%가 흡착되었고 시간이 지남에 따라 증가하여 100분에 98.5%의 흡착률을 나타내었다. 이것은 gluco-amylase를 산성백토에 흡착시켰을 때⁽¹³⁾ 15분, alkaline protease를 silica gel에 흡착시켰을 때⁽¹⁴⁾의 20분 보다는 상당히 긴 시간이며, glucose oxidase를 active carbon 또는 activated alumina에 흡착시켰을 때⁽¹⁵⁾의 2시간보다는 약간 짧은 시간이었다. 이 연구에서는 고정화 효소를 만들 때 필요한 흡착시간을

Table 1. Selection of carrier

Carrier	Adsorption rate(%)	Activity(μ/g)
Kaolin	97.4	21.9
Silica gel (70~230 mesh)	97.3	25.0
Silica gel (200~300 mesh)	84.2	20.0
Active carbon	92.1	22.5
Avicel	92.1	20.6

Carrier:1.0g, Enzyme:47.5units, Adsorption time:100 min

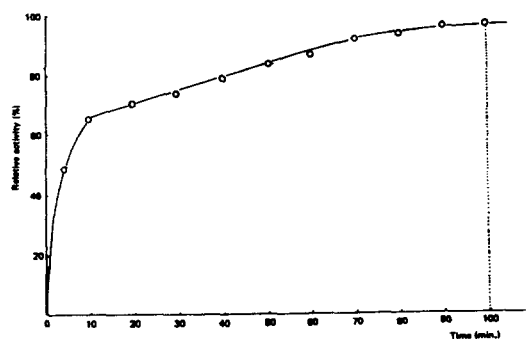


Fig. 1. Adsorption of enzyme as affected by time

100 분으로 결정하였다.

담체량과 효소의 흡착률관계는 그림 2에서 보는바와 같이 담체량 1.2g까지는 급격한 증가를 보였으나 그 이상부터는 완만한 증가를 보였다. 이것은 gluco-amylase를 active carbon에 흡착시켰을 때⁽¹⁵⁾ 또는 protease를 silica gel에 흡착시켰을 때⁽¹⁴⁾의 결과와 비

슷하였다. 본 연구에서는 lipase를 고정화 시키는데 적당한 담체량을 1.6g으로 정하고, 이 때 사용한 효소액의 활성은 4.75 units/ml였으며 효소액 10 ml과 silica gel 1.6g에 흡착된 효소량은 46.25 units였다.

고정화 효소의 성질

Silica gel에 흡착시킨 고정화 효소의 활성을 20~60°C의 범위에서 측정한 결과는 그림 3과 같다. 기질의 종류에 관계없이 가용성 효소와 고정화 효소의 최대활성은 모두 37°C에서 나타났으며, 전체 온도범위에서 고정화 효소는 가용성 효소보다 높은 활성을 보였다.

*Candida cylindracea*에서 얻은 가용성 lipase와 silica gel에 고정화한 lipase를 유지방과 올리브유를 기질로 하여 pH 4~10의 범위에서 활성을 측정한 결과는 그림 4와 같다.

즉, 기질의 종류에 관계 없이 가용성 효소와 고정화 효소의 최적pH는 7.0이었다.

고정화 효소의 열에대한 안정성을 조사한 결과는 그림 5와 같다. 고정화 효소 및 가용성 효소의 열안정성은 각기 35°C와 40°C까지는 같은 활성을 나타내었으나, 가용성 효소는 40°C 이상에서 급격한 활성의 감소를 나타내었고 고정화 효소는 50°C 이상에서 급격한 활

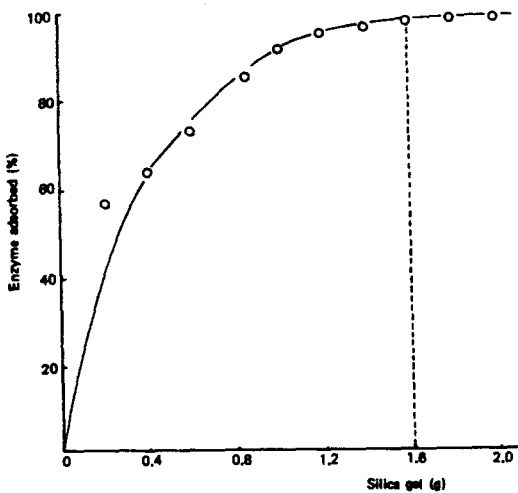


Fig. 2. Adsorption of enzyme by silica gel
Enzyme: 10ml(4.75 unit/ml)
Adsorption time: 100min.

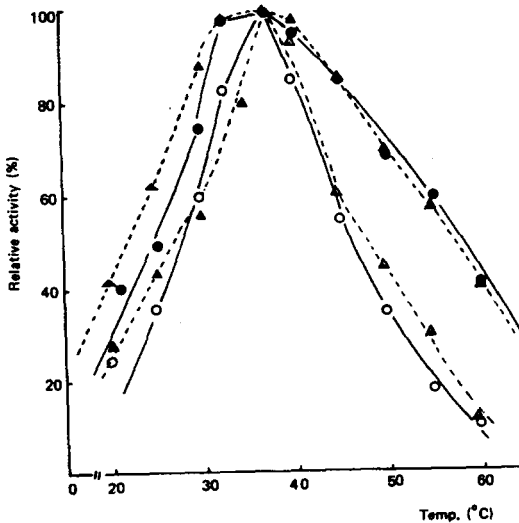


Fig. 3. Effect of temperature on enzyme activity in olive oil

- : Soluble lipase, milk fat
- : Immobilized lipase, milk fat
- △—△ : soluble lipase, olive oil
- ▲—▲ : soluble lipase, olive oil

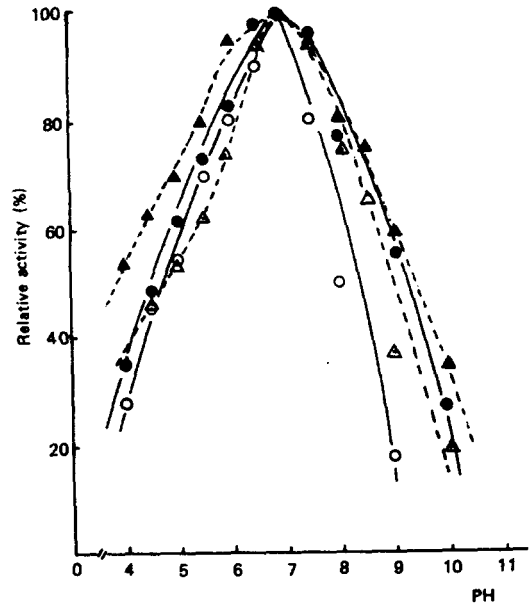


Fig. 4. Effect of pH on enzyme activity in olive oil

- : Immobilized lipase, olive oil
- : Soluble lipase, olive oil
- ▲—▲ : immobilized lipase, milk fat
- △—△ : soluble lipase, milk fat

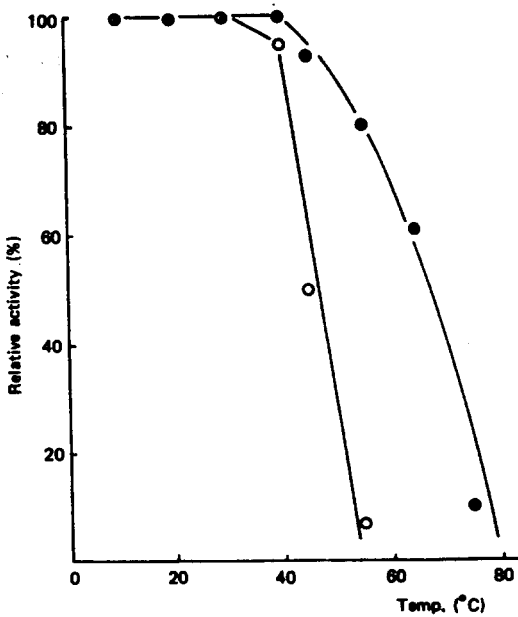


Fig. 5. Heat stability of lipase

●—● : Immobilized lipase
○—○ : Soluble lipase

성의 감소를 나타내었다.

고정화 효소 및 가용성 효소의 pH안정성은 그 6과 같다. 즉, 고정화 효소는 가용성 효소에 비하여 모든 pH범위에서 높은 활성을 보였으며, pH 8 이상의 알카리에서 안정성이 급격히 감소함을 볼 수 있었다.

지방함량 20%의 유지방과 올리브유를 기질로 하여 고정화 효소농도와 초기반응속도와의 관계를 조사한 결과는 그림 7과 같다. 즉, 유지방을 기질로 사용했을 경우 고정화 효소의 농도가 20g까지 증가함에 따라 초기반응속도가 급격히 증가하였으나 그 이상에서는 거의 증가가 없었다. 이 연구에서는 20%유지방에 대한 적정 고정화 효소의 농도를 30g으로 정하였다. 그러나 기질을 올리브유로 했을 경우는 고정화효소의 농도가 80g까지 증가함에 따라 초기반응속도가 계속적으로 증가하였으나, 그 이상에서는 약간의 증가를 보일 뿐이어서 적정효소농도를 80g으로 선정하였다.

기질농도를 5~35%로 변화시키면서 기질농도가 고정화 lipase의 반응속도에 미치는 영향을 조사한 결과는 그림 8과 같다.

고정화 lipase는 유지방과 올리브유에 대하여 기질농도가 20%까지 증가함에 따라 초기반응속도의 현저한 증가를 보였으며, 그 이상에서는 완만히 증가하였다. 이 연구에서는 최적기질농도를 유지방과 올리브유에 대하여 20%로 선정하였다.

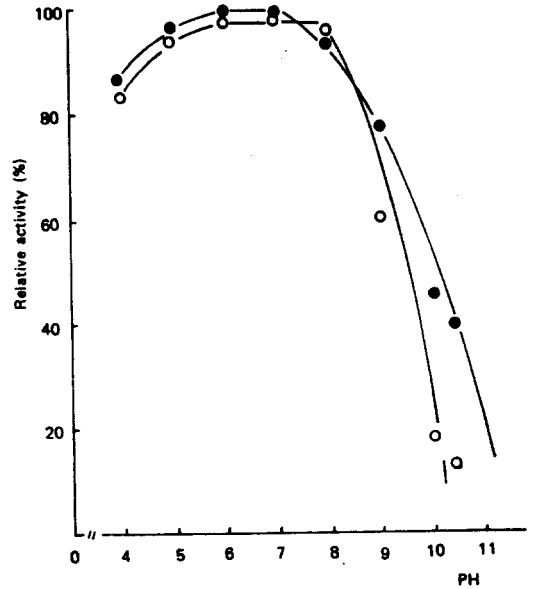


Fig. 6. pH stability of lipase in olive oil

●—● : Immobilized lipase
○—○ : Soluble lipase

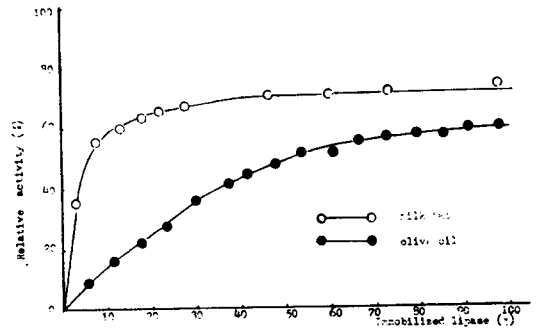


Fig. 7. Initial reaction rate of immobilized lipase as affected by enzyme concentration

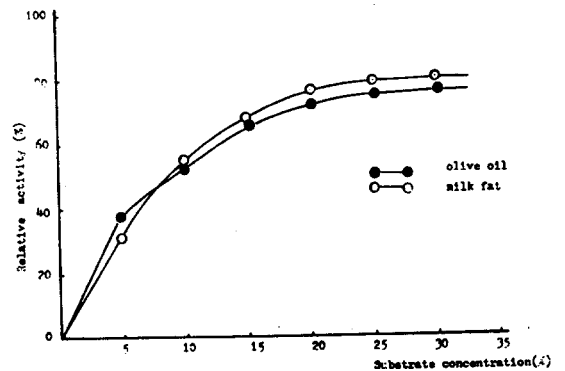


Fig. 8. Initial reaction rate of immobilized lipase as affected by substrate concentration(%)

고정화 효소에 의한 지방 가수분해

고정화 효소의 반응시간에 따른 반응물을 조사하기 위하여 가용성 효소와 대조하여 24 시간 반응시킨 결과는 그림 9와 같다. 고정화 효소는 반응개시 후 8 시간 까지 급격한 유지방의 분해를 나타내었으나 가용성 효소는 4 시간까지 급격한 분해를 나타내고 그 이상에서는 완만하였다. 그리고 고정화 효소는 가용성 효소보다 유리지방산 생성물이 현저히 낮은 것을 볼 수 있다. (그림 9).

가용성 및 고정화 효소를 유지방에 작용시켜 유리된 지방산을 HPLC로 분석한 결과는 표 3과 같다. 즉, 반응 4 시간과 8 시간에 시료를 취하여 유리지방산을 분석한 결과 가용성 효소의 경우 반응이 진행됨에 따라 저급지방산의 생성물이 높아졌으나, 고정화 효소의 경우는 뚜렷한 경향을 나타내지 않았다. 또한, 특이한 점은 capric acid의 경우 가용성 효소에서 반응 4 시간에 29.27%, 반응 8 시간에 50.54%로 높은 함량을 보였으며, 고정화 효소에서도 함량이 비교적 높았다. 그리고 가용성 효소에서 높은 함량을 보인 butyric acid가 고정화 효소에서 낮았으며, 반면에 고정화 효소에 의해 다량 생성된 myristic acid가 가용성 효소에 의해 적게 생성되었음을 알 수 있었다.

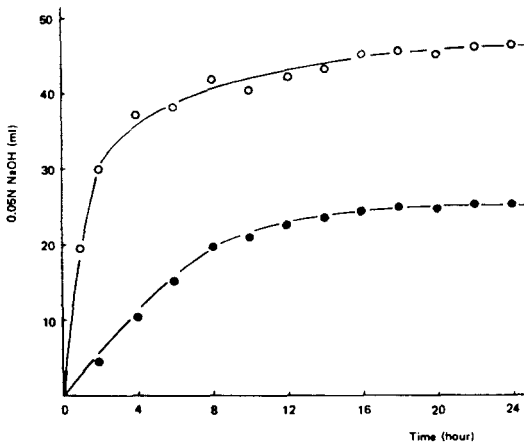


Fig. 9. Hydrolysis of milk fat by soluble and immobilized lipase

○—○ : Soluble lipase
●—● : Immobilized lipase

요 약

Lipase를 유지분해에 이용하기 위한 기초연구로서 *Candida cylindracea*에서 추출된 lipase를 흡착법에 의해 고정화하고 그의 반응특이성을 본 결과는 다음과

Table 2. Free fatty acids profile released from milk fat by *Candida cylindracea* lipase

Fatty acid	Soluble		Immobilized	
	4hr.	8hr.	4hr.	8hr.
C ₄	9.04	17.48	0.43	1.37
C ₆	1.85	2.21	0.31	1.41
C ₈	0.78	2.73	0.21	1.44
C ₁₀	29.27	50.54	9.37	20.15
C ₁₂	4.29	0.78	3.54	2.09
C ₁₄	2.36	2.89	46.68	23.76
C ₁₆	31.52	21.65	23.71	15.86
C ₁₈	20.89	1.73	15.75	29.90

같다. Lipase의 흡착에 적합한 흡착제로는 silica gel이 선정되었으며, Silica gel 1.6g에 lipase 47.5 units를 5°C, pH 7.0에서 100분간 흡착시키는 것이 좋았다. Silica gel에 고정화 시킨 lipase를 유지방과 olive oil의 분해에 적합한 최저온도 및 최적pH는 가용성 효소와 비교시 37°C, pH 7.0으로 변하지는 않았으나 활성의 범위는 넓어졌다. 또한 열안정성 및 pH안정성도 가용성 효소에 비하여 활성의 범위가 넓어졌다. 유지의 분해에 적합한 고정화 효소의 최적효소농도는 유지방의 경우 30g이었으며 올리브유의 경우 80g으로 선정하였다. 이 때 최적기질농도는 유지방 및 올리브유 모두 20%였다. 반응시간에 따른 반응물은 유지방을 이용하여 조사한 결과 가용성 효소는 반응 4 시간까지는 급격한 분해를 나타냈으나 고정화 효소는 8 시간 까지 급격한 증가를 나타내고 그 이상은 거의 일정하였다. 또한 유리되는 지방산의 profile은 가용성 효소와 비교시 capric acid의 생성은 모두 높았으며, myristic acid의 함량은 높고 butyric acid의 함량은 적었다.

문 헌

1. Shahani, K.M.: *Enzymes in Food Processing*, G. Reed, ed. (2nd. ed.) Academic Press, N.Y., p. 181 (1975)
2. Seitz, E.W.: *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **51**, 12 (1974)
3. Kanisawa, T., Yamaguchi, Y. and Hattori, S.: *J. Japan Soc. Food Sci. Jech.*, **29**, 693 (1982)
4. Tanabe Seiyaku Co. Ltd.: *Japanese Patent* 20, 560 (1970)
5. Kobayashi, T., Kato, I., Ohmiya, K. and Shimizu, S.: *Agr. Biol. Chem.*, **44**, 413 (1980)

6. Brandenberger, H.: *Rev. Ferment. Ind. Aliment.*, **11**, 237 (1956)
 7. Brockman, H.L., Law, J.H. and Kezdy, F.J.: *J. Biol. Chem.*, **248**, 4965 (1973)
 8. Lieberman, R.B. and Ollis, D.F.: *Biotech. Bioeng.*, **17**, 1401 (1975)
 9. 권대영: 한국과학기술원 석사학위논문 (1983)
 10. Kubo, M., Karube, I. and Suzuki, S.: *Biochem. Biophys. Res. Commu.*, **69**, 731 (1976)
 11. Yamada, K., Ota, Y. and Machida, H.: *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, **36**, 860 (1962)
 12. Bills, D.D., Khatri, L.L. and Day, E.A.: *J. Dairy Sci.*, **46**, 1342 (1963)
 13. 宇佐美昭次, 山田徹, 木村昭子: *醸酵協會誌*, **25**, 613 (1967)
 14. 전문진, 심상국, 정동효: 한국산업미생물학회지, **6**, 33 (1978)
 15. Miyamoto, K., Fugii, T. and Miura, Y.: *J. Ferment. Technol.*, **49**, 565 (1971)
- (1984년 11월 28일 접수)