

효소에 의한 우지의 가수분해 반응

김인호* · 박태현

럭키중앙연구소, 대덕단지 사서함 10

Enzymatic Hydrolysis of Beef Tallow

Kim, In-Ho* and Tai-Hyun Park

Lucky Central Research Institute, P.O. Box 10, Taeduk Science Town, Taejeon 305-343, Korea

Abstract — Beef tallow was hydrolyzed with lipase under the conditions of liquid state and solid state. Lipase OF 360 was used for that purpose, and the lipase had the maximum activity when the olive oil was used as a substrate at pH 6 and 37°C. Beef tallow was dispersed by an agitator to perform a liquid enzymatic reaction. Water content, reaction temperature, and enzyme amount were varied as parameters affecting hydrolysis percentage. Ninety three percents of tallow were hydrolyzed at the following conditions: water content 80% w/w, temperature 37°C, and enzyme amount 200 unit/g tallow. In order to conduct a solid phase enzymatic reaction, sonication was employed for pretreating tallow with the enzyme solution. Molten tallow was sonified with the enzyme solution, and solidified by lowering temperature. And then hydrolysis reaction proceeded at 30°C. Sonication intensity and time were varied to control hydrolysis percentage. Optimum values of the intensity and the time were found to exist since the hydrolysis percentage did not increase further according to the increases of the intensity and the time.

천연지방으로부터 지방산을 생산하는데 보편적으로 사용되는 공정은 Colgate-Emery 방법으로써(1), 고온(250°C)과 고압(50 atm)하에서 연속적으로 지방을 가수분해시키는 공정이다. 이 공정은 많은 에너지를 필요로 하며 고온고압에 견디는 장치들은 필요로 한다. 1·2차 석유파동 이후 에너지 과소비 공정의 대체를 위하여 일본에서는 lipase를 이용한 지방분해 공정이 연구되어 왔고(2), 이는 1970년대에 활발히 진행된 미생물 유래의 lipase에 대한 많은 연구들에 힘 입은바 크다(3-5).

Lipase를 이용한 지방분해 공정을 일본 회사들이 특허 제출하였는데 이를 살펴보면 다음과 같다. 특허공고 소46-16509(6)에서는 유지에 물과 lipase를 가하여 유지를 가수분해하고 분해종료 후 유층, 유화층, 수층의 3층으로 정지하고 유화층에 있는 잔존 효소를 다시 유지분해에 사용하였다. 특허공고 소46-

28039(7)에서는 유지의 응고점 이상에서 유지, 물 그리고 lipase의 유탁액을 만들어 되도록 저온에서 교반하여 가수분해 반응을 수행하였다. 분해율이 30~60%에 달하면 온도를 응고점 이하로 내려 유탁액을 그대로 고화하여 가수분해를 계속해 분해율 90% 이상을 얻었다. Satoh 등(8)은 5000 rpm 정도의 고속 회전기로 유지와 물을 섞어 유화상태에서 효소분해 반응을 수행하였다. 한편 소수성 막을 이용하여 유지와 효소용액을 접촉시켜 유지를 분해하거나(9) 글리세라이드 합성(10, 11)을 수행한 연구도 보고되고 있다.

본 연구에서는 유지를 녹인 후 초음파를 이용하여 lipase 용액과 유탁액을 만들고, 온도를 낮추어 유지를 고화시켜 효소반응을 수행하였다. 초음파는 유화액을 만드는데 유용하며 동물조직에서 단백질을 추출할 때도 사용된다(12, 13). 사용된 효소는 일본 메이토 회사의 lipase(Lipase OF)로서 *Candida cylindracea* 균주에서 생산된 것이다. Lipase OF의 효소 특성을 올리브유를 기질로 하여 실험한 후 공업용 유지를

Key words: Lipase, tallow, sonication
*Corresponding author

기질로 하여 효소반응을 액체상과 고체상에서 수행하여 두 반응을 비교하였다.

재료 및 방법

효소 및 시약

메이토회사(Tokyo, Japan)의 Lipase OF는 분말상의 제품으로 표시역가는 340 unit/mg이었다. 올리브유는 고순도로 정제된 것(Ideda, Japan)이었고 우지(tallow)는 공업용으로 규격은 Table 1과 같다. 기타 사용된 시약은 특급시약이었다.

효소역가 측정

0.1 M 인산 완충용액(pH 7) 4 ml를 검체용 시험관과 blank용 시험관에 각각 넣고 여기에 10°C에서 유화된 올리브유 5 ml를 넣었다. 올리브유는 Poly vinyl alcohol과 3:1로 섞어 얼음에서 냉각하면서 10°C에서 10분간 유화시킨 후에 제조한 것이었다. 상기의 각 시험관을 37°C 항온조에서 5분간 예열한 후 blank용 시험관에는 가열하여 실활된 lipase 용액 1 ml, 검체용 시험관에는 희석 배수 5000배의 lipase 용액 1 ml를 넣어 교반한 후 50분간 37°C에서 반응시켰다. 50분 경과 후 20 ml의 아세톤-에탄올(1:1) 용액을 각각 가하여 반응을 종료시키고 50 ml의 삼각 플라스크에 옮겨 1%의 페놀프탈레인 용액 2방울을 가한 후 0.05 N NaOH 10 ml을 가하고 0.05 N HCl로 적색이 소실되는 점을 최종점으로 하여 적정해서 T_0 과 T_{50} 을 구했다. 역가 계산식은 다음과 같다.

$$\text{Lipase 역가(U/g)} = (T_{50} - T_0) \times 10 \times 5000$$

pH 변화에 따른 상대역가

pH 구간이 4~6사이는 초산 완충용액, pH 6~9사이에서는 인산 완충용액을 조제하여 효소역가 측정 방법에 따라 역가를 측정하여 상대역가로 환산하였다.

온도 변화에 따른 상대역가

효소역가 측정방법에 따라 pH 7에서 온도를 20~50°C 사이로 변화시켜 실험하였다. 실험결과를 상대역가로 환산하였다.

액상 효소반응

Table 1. Specification of tallow

Item	Specification
Titer	41°C±1
Free fatty acid	<5%
Saponification value	>196
Acid value	<10
Iodination value	<55

우지를 lipase 용액과 삼각 플라스크에서 500 rpm으로 교반하여 반응시켰다. 반응온도는 37°C와 42°C, 효소사용량은 100 U/mg tallow와 200 U/mg tallow, 물과 우지의 비율은 40%와 80%였다. 우지사용량은 100 g이었고 일정간격으로 반응액을 피펫으로 취하여 15분간 1000 rpm에서 원심분리하여 지방산 층을 분리한 후 산값을 측정하였다(14).

고상 효소반응

가열하여 녹인 20 g의 43°C 우지에 같은 양의 43°C 효소용액을 떨어 뜨리면서 초음파 발생기(Sonicator, Branson Model W-220F)로 우지와 효소용액을 혼합한 후 얼음으로 냉각하여 응고시켰다. 응고된 우지를 30°C로 유지하여 우지 분해반응을 시켰고 시간에 따라 시료를 채취하여 산값을 측정하였고 전자현미경 시료로 사용하였다. 고체시료를 끓는 물에 넣어 효소를 불활성화 시킨 후 냉각하여 이것을 물로 세척하여 글리세롤을 제거하였다. 여과한 시료를 건조시켜 수분을 제거한 후 산값과 비누화 값을 측정하고, 가수분해율을 다음식에 의해 계산하였다.

$$\text{가수분해율} = \frac{\text{산값}}{\text{비누화 값}} \times 100(\%)$$

전자현미경 사진촬영

반응개시 후 25시간 후에 고체시료를 취하고 고체 CO₂로 얼린 후 깎아 다음 그 단면을 주사전자현미경(SEM, Jeol ASID 4D)을 이용하여 사진촬영하였고 이 때 배율은 1000배 였다.

결과 및 고찰

pH 변화에 따른 상대역가

Fig. 1은 pH 변화에 따른 상대역가를 비교한 결과이다. pH가 6일 때 Lipase OF 360은 최대역가를

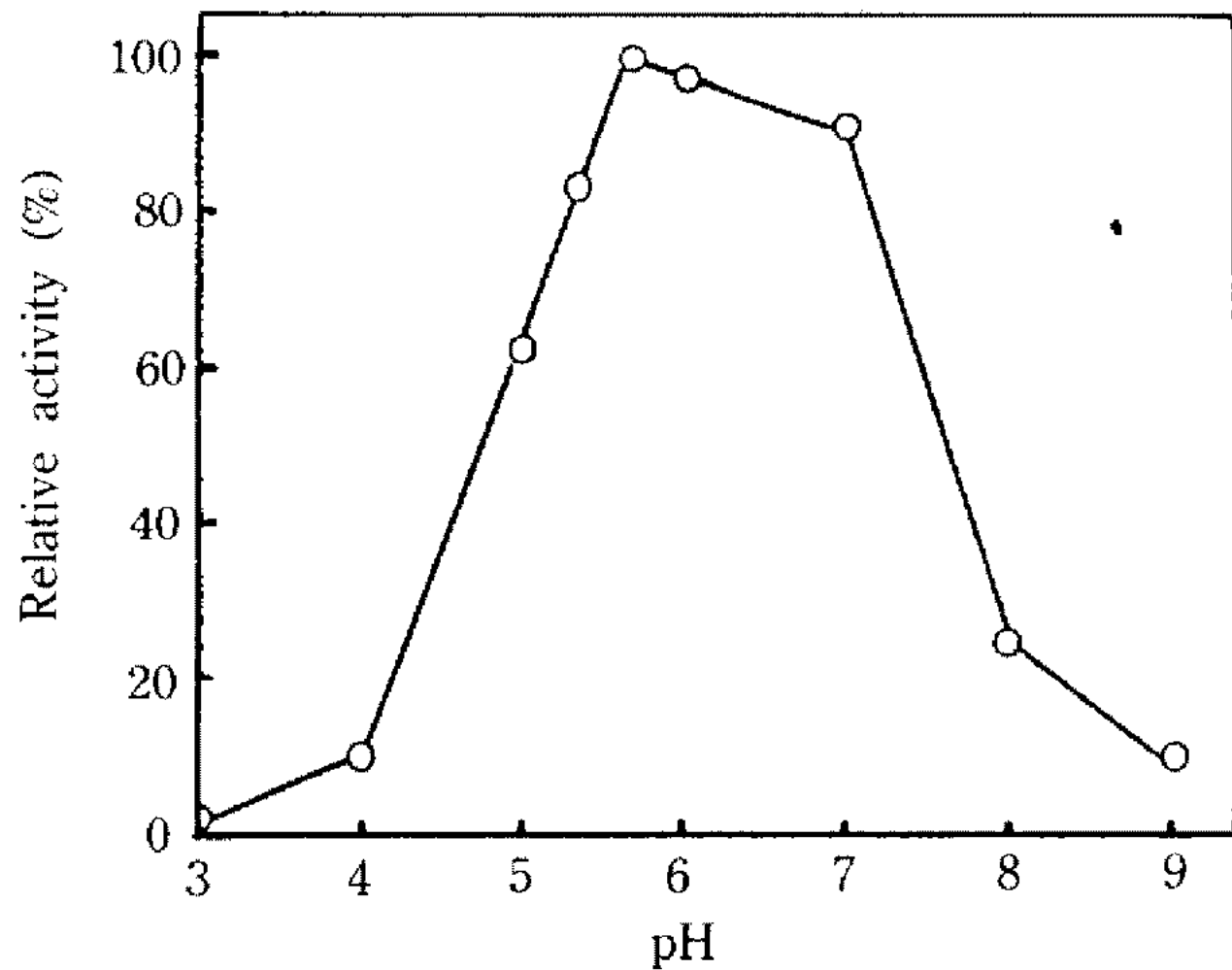


Fig. 1. Relative activity curve under various pH conditions.

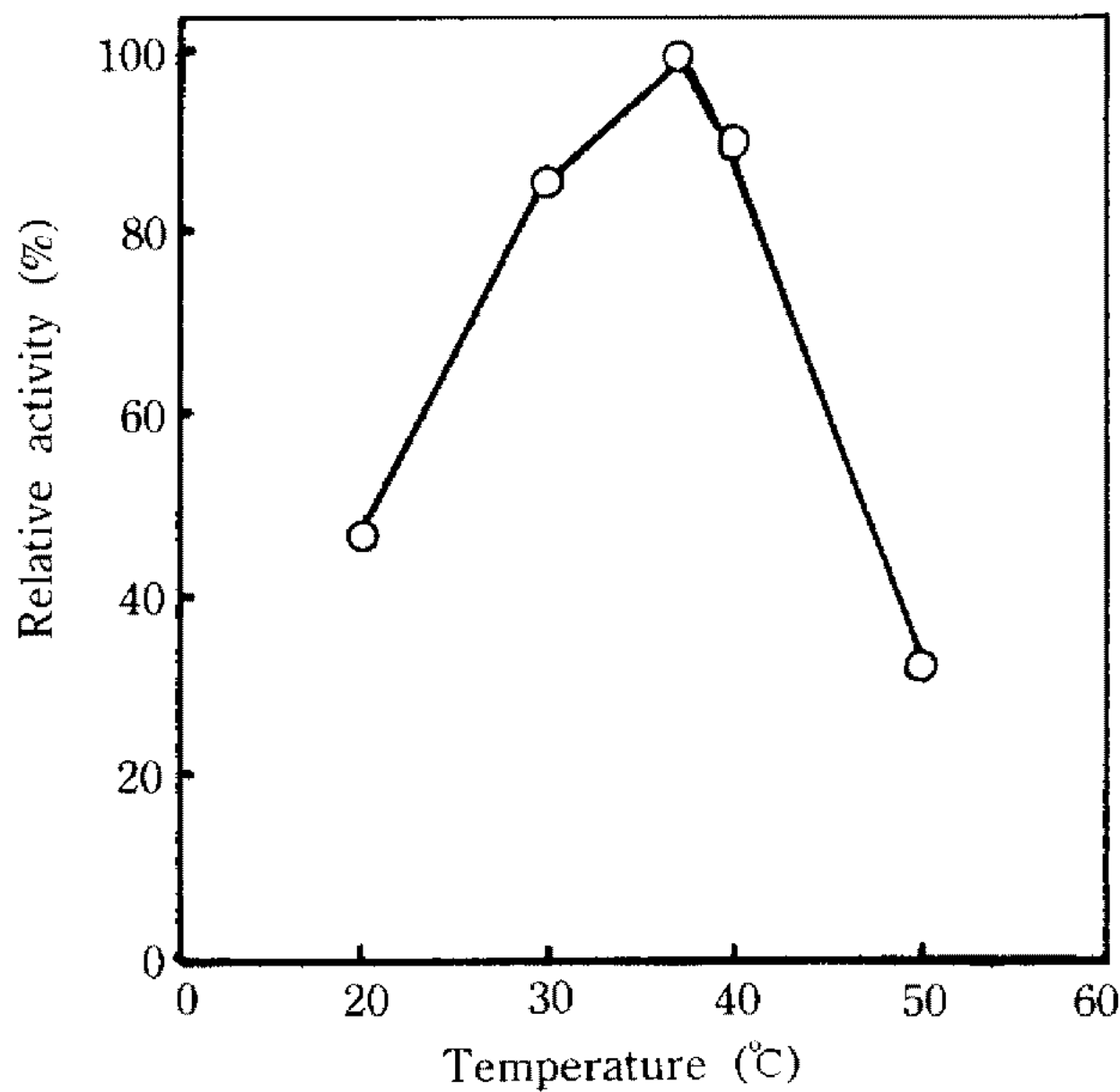


Fig. 2. Effect of temperature on activity.

나타내며, 알칼리성 pH에서의 역가 감소가 산성 pH의 역가 감소보다 감소속도가 작았다. 이는 유지의 가수분해시 생성되는 수소이온이 알칼리성 pH에서는 제거가 용이하여 가수분해가 더 많이 진행되기 때문이다. 최적 pH는 문헌 15에 보고된 최적치(pH 5~6)와 일치하였다.

온도 변화에 따른 상대역가

Fig. 2에서 온도에 따른 Lipase OF 360의 역가를 비교하면, 30~40°C 사이에서 최대 활성을 갖고 있으며 45°C까지 효소역가의 감소가 그리 크지 않음을 (최대역가의 70%) 알 수 있었다. 따라서 고상 효소 반응에서 43°C에서 유지를 녹여 효소용액과 수분이

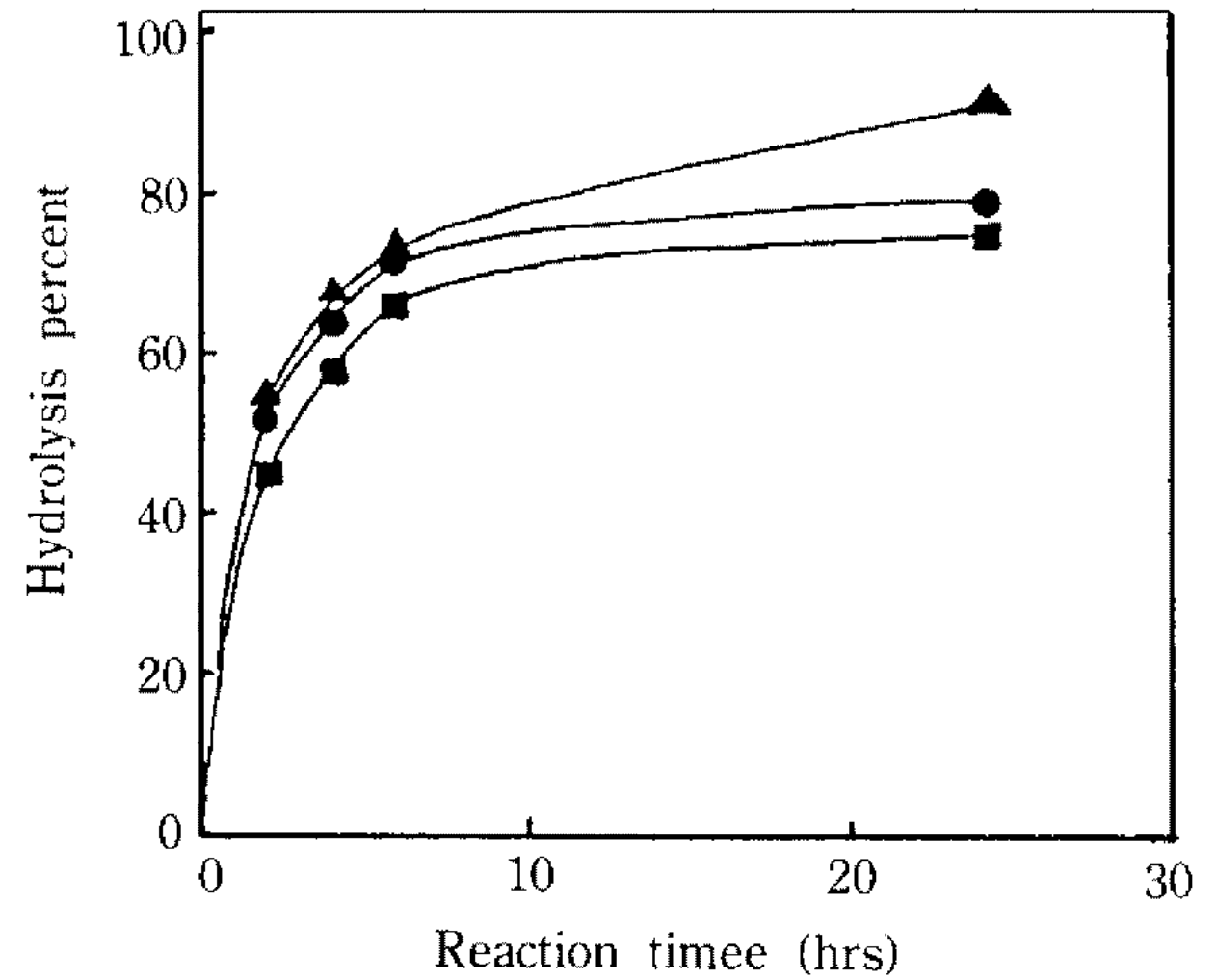


Fig. 3. Effect of temperature and water content on the hydrolysis of dispersed tallow.

Lipase amount: 100 unit/g tallow; ▲: 37°C and 40% water; ●: 37°C and 80% water; ■: 42°C and 80% water.

내에 혼합할 때 효소의 실패는 우려할 정도가 아니라고 판단하였다.

액상 효소반응

유지를 Lipase를 이용하여 가수분해시킬 때 중요 반응변수로 온도, 물사용량, 그리고 lipase 사용량을 고려하였다. 유지가 물에 분산되어 교반상태에서 반응이 진행되므로 온도는 유지의 용융점 41°C 주변의 두 점(37°C와 42°C)을 잡았으며, 물 사용량은 유지의 분산이 가능한 최소 물사용량 40% water wt/tallow wt와 최대 물사용량 80%를 선택하였다. Fig. 3에 의하면 반응개시 6시간까지 급격히 반응이 진행되었으며 그 후에는 서서히 반응이 진행되었다. 물사용량 80%에서 온도의 영향을 보면 37°C의 24시간 후 분해율이 79%로 42°C의 분해율 75%보다 약간 높았으며 올리브유를 기질로한 Fig. 2의 결과와 유사하였다. 또 37°C에서 물사용량 40%와 80%를 비교하면 40% 경우의 분해율이 93%로 80% 경우의 분해율 79%보다 높음을 알 수 있었다. 이는 물이 많을 경우 반응후기에서 유지와 효소가 접촉할 기회가 줄어들기 때문이라고 생각된다. 그러나 40% 경우 교반중간에 유지의 응집체가 자주 발생하여 재현성 있는 좋은 가수분해율을 얻기가 힘들었다. 효소 제조사의 자료(16)에 의하면 올리브유의 경우 물사용량을 60%로 조절하였다. 유지의 경우에는 교반을 용이하게 하기 위해 물사용량을 80% 이상으로 하는 것이 필요하였다. Fig.

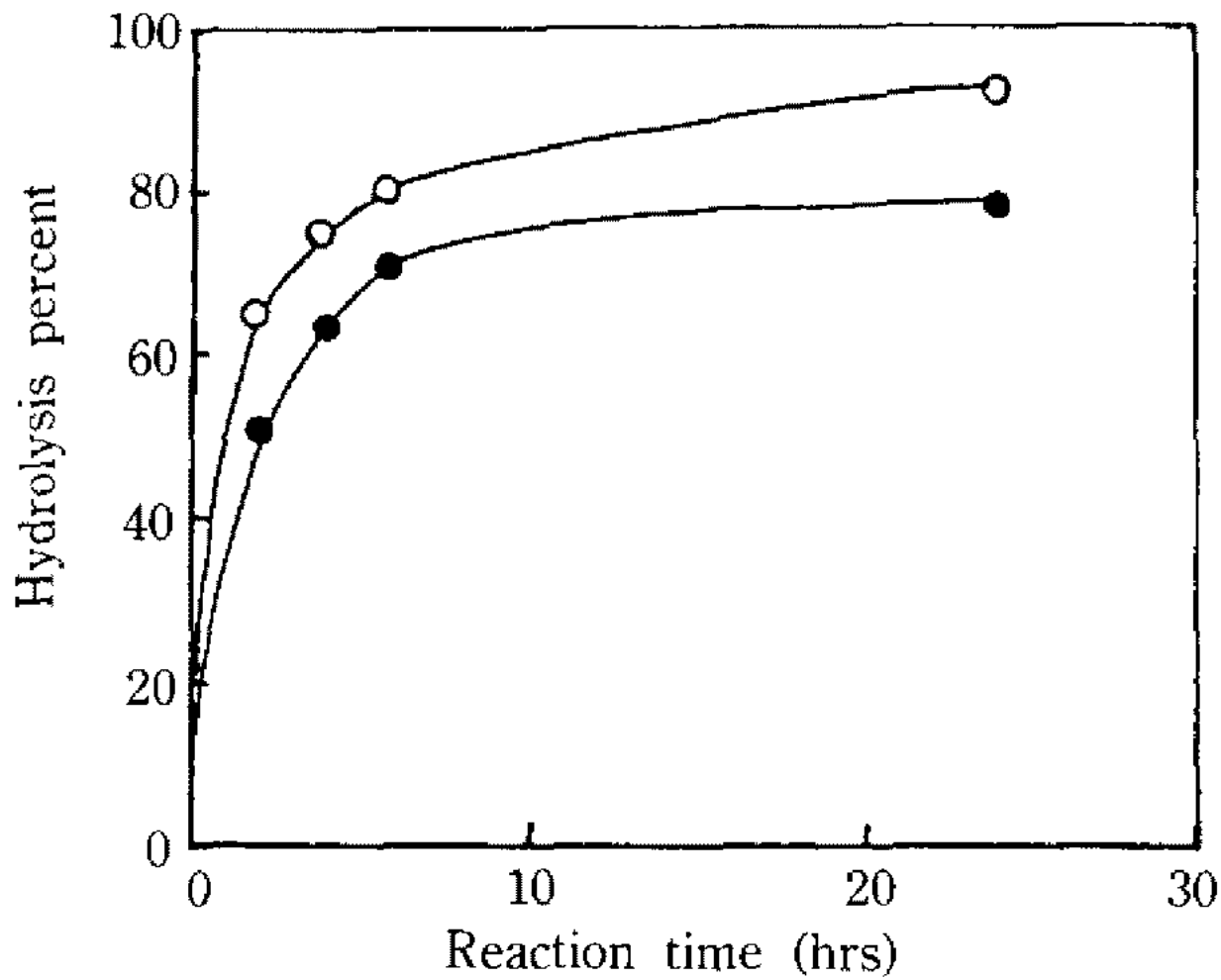


Fig. 4. Effect of lipase amount on the hydrolysis of dispersed tallow (100 g).
Water content 80 ml; temperature 37°C; ●: 100 unit/g tallow; ○: 200 unit/g tallow.

4에서는 온도를 37°C, 물사용량을 80%로 하여 효소 사용량을 바꾸어 실험한 결과를 보여 주고 있다. 효소 단위의 증가에 따라 24시간 후 가수분해율이 크게 차이가 났다. 우지 단위 그램당 효소를 200단위 사용했을 때 분해율이 93%로 100단위 사용했을 때 분해율 79%보다 매우 컸다. Fig. 3과 Fig. 4를 비교하면 lipase 사용량의 변화가 온도나 물사용량의 변화보다 용이하 며, 가수분해율에 미치는 영향이 큼을 알 수 있다. 그러나 효소사용량을 무조건 증가시키는데에는 경제성 문제로 한계가 있다. 상기 가수분해율 93%는 물사용량 100%, 효소사용량 200 unit/g tallow의 경우 보고된 가수분해율 94%에 근접한 값이었다(16).

고상 효소반응

우지와 효소를 43°C에서 초음파를 이용하여 혼합한 후 30°C로 식혀 우지가 굳은 상태에서 우지 가수분해 반응을 수행한 결과, Fig. 5와 같은 초음파 강도가 30 (80 watt)일 때 초음파 적용시간을 매개변수로 하여 실험한 시간에 따른 가수분해 곡선을 보여 주고 있다. 액상반응과 같이 초기 6시간까지 급격히 가수분해가 진행되다가 그 후에 서서히 우지가 가수분해 되었다. 초음파 적용시간이 1분, 2분, 2분일 때 24시간 후 각각의 가수분해율이 73%, 82%, 94%였다.

초음파 적용시간이 증가할수록 가수분해율이 비례하여 증가함을 알 수 있었다. 초음파 적용시간이 길수록 우지가 효소용액과 잘 혼합되어 반응이 효율적으로 진행됨이 밝혀졌다. 초음파 강도를 증가시키면서

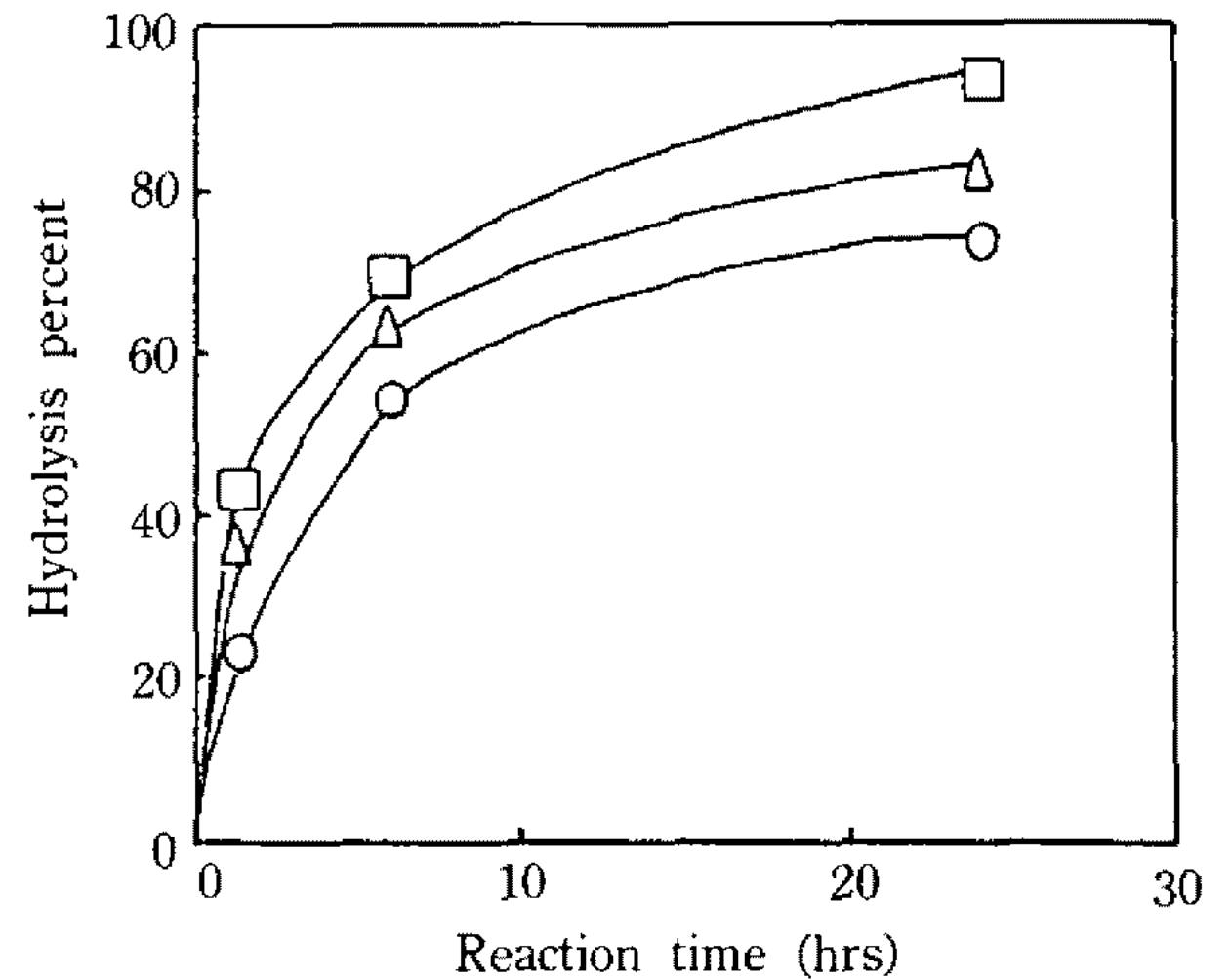


Fig. 5. Hydrolysis history of the solidified tallow.
Tallow 20 g, water 20 ml, lipase 350 unit/g tallow, sonication intensity 30; sonication time, ○: 1 min, △: 2 min, □: 3 min.

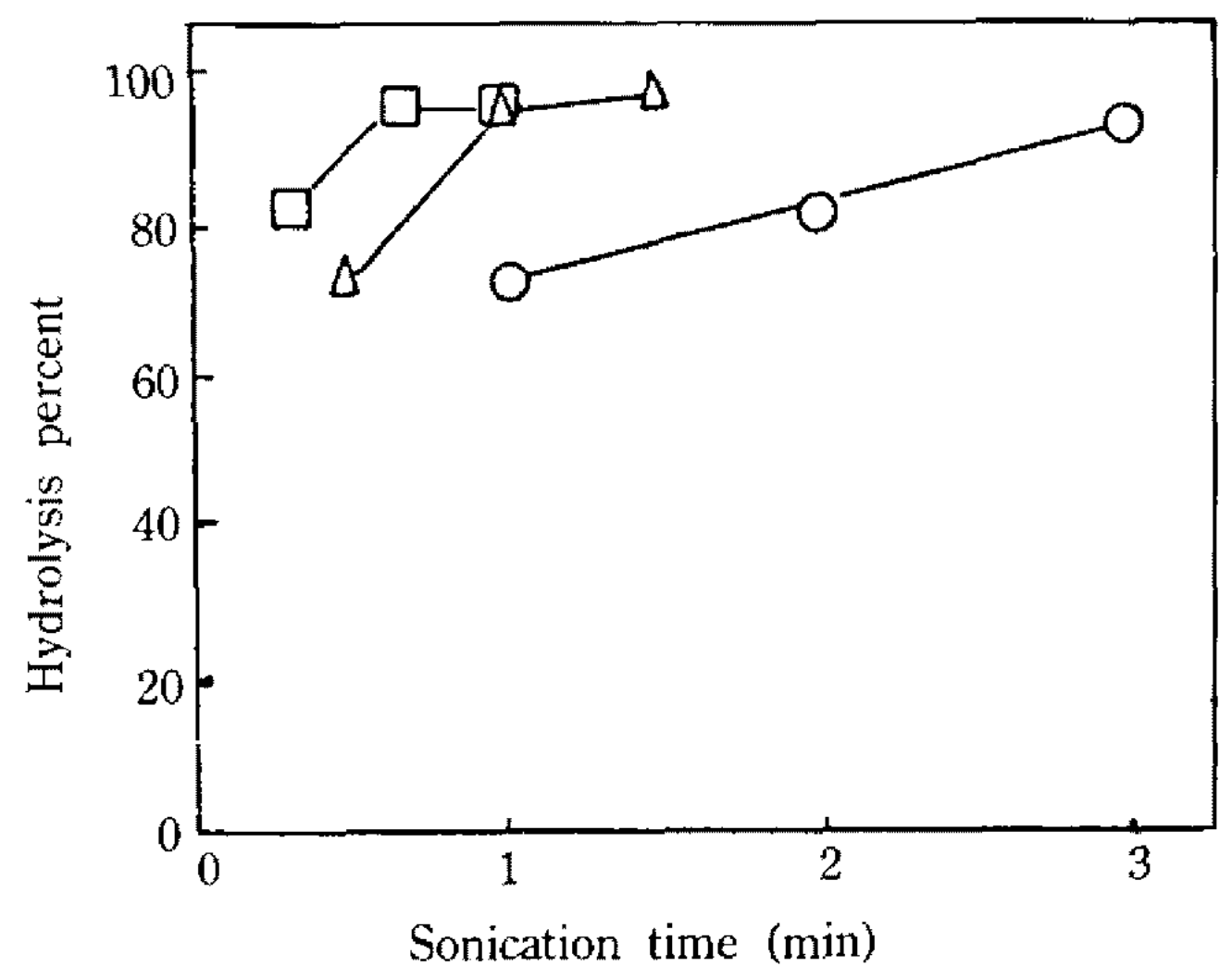


Fig. 6. Effect of sonication time on the hydrolysis of the solidified tallow (20 g).
Water 20 ml, temperature 30°C, lipase 350 unit/g tallow; sonication intensity, ○: 30, △: 50, □: 68.

실험한 가수분해율을 24시간을 기준으로 하여 Fig. 6에서 비교하였다. 초음파 강도 30(80 watt)에서는 초음파 적용시간의 증가에 비례하여 가수분해율이 증가하는 반면, 강도 50(100 watt)에서는 적용시간에 비례하여 가수분해율이 증가하지 않았다. 강도 50에서 적용시간 1분과 1.5분의 경우 분해율이 거의 같아 초음파 적용시간에 최적값이 있음을 알 수 있다. 강도 68(130 watt)에서는 오히려 강도 50의 경우보다 최대 가수분해율이 떨어졌다. Fig. 6의 결과를 해석하기 위해 효소 활성 저하와 분산도 차이의 관점에서 초음파 투입시 우지-효소용액의 온도 상승과 전자현미경 사

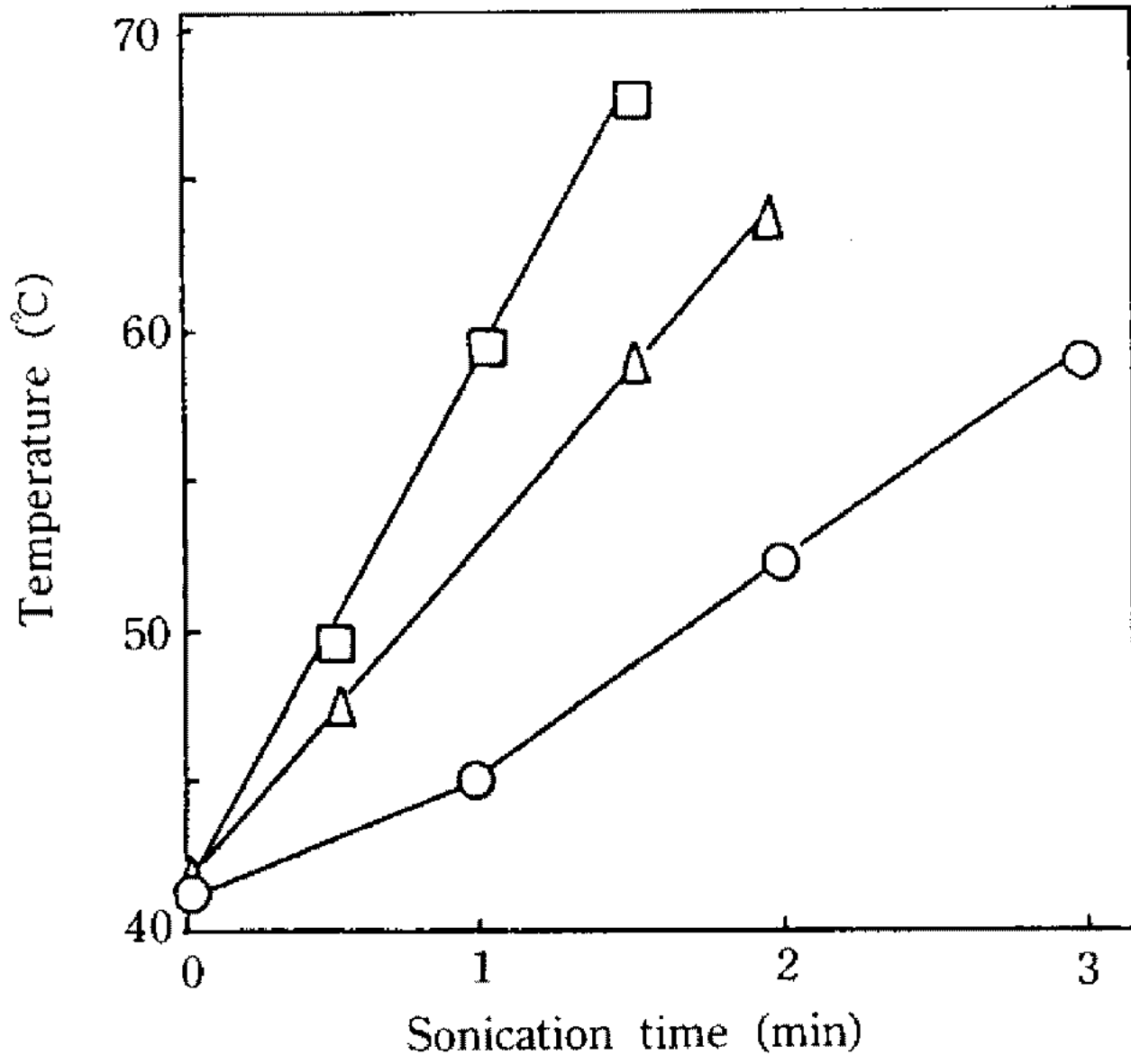


Fig. 7. Temperature rise of fat-water emulsion under various sonication conditions.
Sonication intensity, ○: 30, △: 50, □: 68.

진을 비교검토 하였다. Fig. 7에서 보면 강도 30의 경우 적용시간 3분에서 온도가 60°C까지 상승하였다. Lipase의 열안정성은 50°C, 15분 동안 효소를 처리하였을 때 90%의 초기 역가를 유지한다고 보고되어 있다(17). 강도 30의 결과에서 적용시간의 증가에 따라 가수분해율이 상승하는 것으로 미루어 60°C의 온도까지 온도 상승이 일어나는 것은 효소 활성화에 영향을 미치지 않으리라고 사료된다. 강도 50, 68의 경우 온도에 의한 효소 활성변화의 영향을 배제한다면, 초음파 강도 및 적용시간이 분산도에 영향을 미쳐 가수분해율이 변화한다고 추측할 수 있겠다. Fig. 8A에서 보면 강도 30에서 적용시간을 증가시키기에 따라 우지내부에 생긴 공간이 작아짐을 알 수 있다. 공간은 전자현미경 촬영시 시료를 액체 CO₂로 얼린 후 물을 승화시킴으로 생긴 것으로, 효소용액이 차지했던 공간이므로 공간의 크기와 분포가 분산도를 표시하게

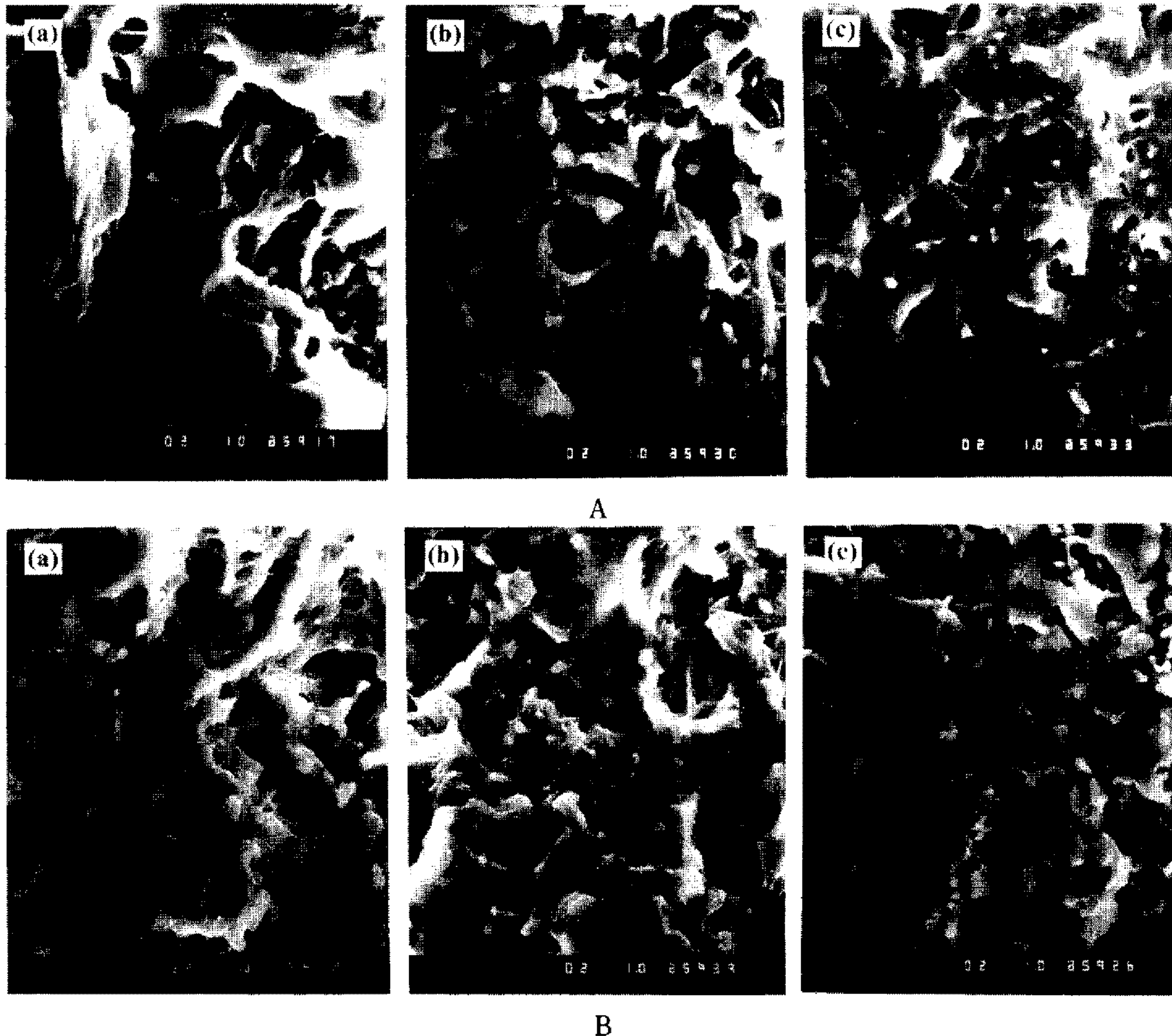


Fig. 8. Electron microscopic pictures of fat-water emulsion with variation of sonication conditions.
Magnification $\times 1000$; A: sonication intensity 30, (a) 1 min, (b) 2 min, (c) 3 min; B: sonication intensity 68, (a) 20 sec, (b) 40 sec, (c) 60 sec.

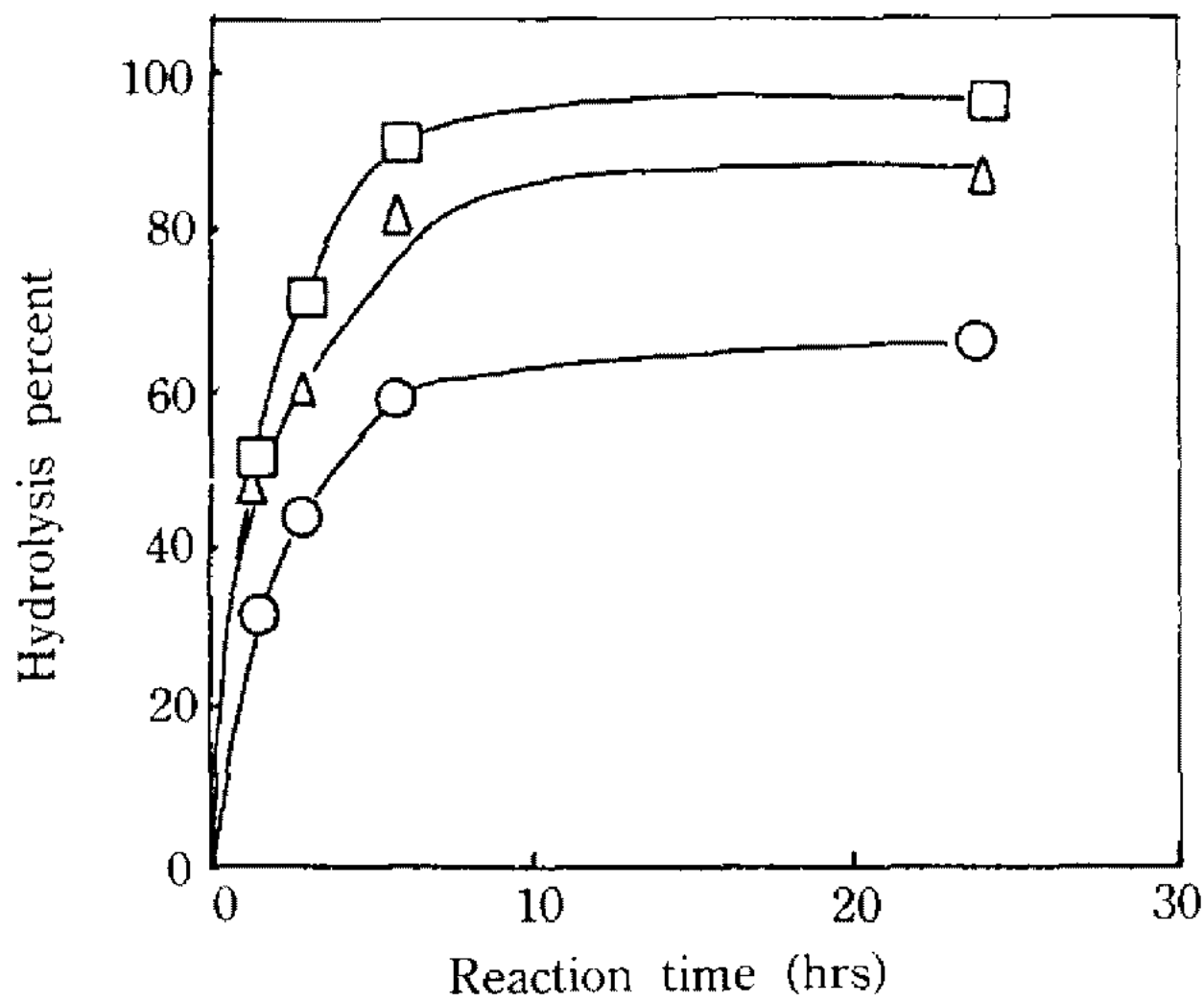


Fig. 9. Effect of lipase amount on the hydrolysis of the solidified tallow (20 g).

Water 20 ml, temperature 30°C, sonication intensity 50, sonication time 1.5 min; lipase amount (unit/g tallow), □: 500, △: 200, ○: 100.

된다. 작은 공간이 고르게 많이 우지내에 분포함으로써 효소가 우지와 접촉할 확률이 커지고 거기에 따라 가수분해율이 증가함을 알 수 있다. Fig. 8B의 경우 강도 68에서는 적용시간 20초 40초 사이에는 공간 크기 차이가 보이나, 적용시간 40초와 60초 사이에는 공간크기 차이가 없음을 알 수 있다. 특히 60초의 경우 우지 표면에 돌기가 많이 보이는데 이는 우지가 작은 방울로 분산되었다가 다시 응집된 것이다. 이 현상은 Coalescence 효과(12)라고 하며 초음파를 과도하게 가한 결과이다. 효소사용량에 따른 가수분해율 변화를 Fig. 9에 보였다. 사용량을 우지 단위 g당 100, 200, 500으로 증가시켰을 때 24시간 후 가수분해율이 66%, 87%, 97%로 증가하였다. Fig. 4의 액상반응과 비교하면 고상반응의 분해율이 24시간을 기준으로 액상반응의 분해율보다 떨어졌다. 그러나 고상반응의 반응온도가 30°C이므로 액상반응과 같은 기준으로 비교할 수는 없었고 고상반응이 교반이 필요없는 장점을 갖고 있으므로 효소사용량을 많이 했을 때 액상반응과 필적할만한 결과를 얻을 수 있겠다.

요 약

우지를 lipase에 의해 지방산과 글리세린으로 분해하는 반응을 액상 및 고상에서 수행하였다. 올리브유를 기질로 lipase OF 360(일본 메이토사 제품)의

특성을 조사한 결과 최적 pH는 6, 최적 온도는 37°C이었다. 우지를 기질로 액상 효소반응을 수행한 결과는 물사용량 80% wt/wt, 온도 37°C, 효소사용량 200 unit/g tallow 조건에서 93%의 가수분해율을 얻을 수 있었다. 고상 효소반응에서 43°C에서 녹은 우지와 효소용액을 초음파를 이용해 분산시킨 후 30°C로 우지를 굳혀 가수분해 반응을 수행하였다. 분산도에 미치는 인자로 초음파 강도와 시간이 중요한데 강도와 시간에 최적값이 존재하며, 최적의 분산상태에서 가수분해가 잘 진행되었다. 물사용량 100% wt/wt, 온도 30°C, 효소사용량 200 unit/g tallow, 초음파 강도 50(100 watt), 우지 20 g, 초음파 적용시간 1.5분의 조건에서 87%의 가수분해율을 얻을 수 있었다.

참고문헌

1. Kirk Othmer, Encyclopedia of Chemical Technology, vol. 4, 3rd ed., John-Wiley and Sons, New York, 835 (1978)
2. Japanese Patent JP 57-57799 (1982)
3. Tsujisaka, Y., M. Iwai and Y. Tominaka: *Agr. Biol. Chem.*, **37**, 1457 (1973)
4. Iwai, M. and Y. Tsujisaka: *Agr. Biol. Chem.*, **38**, 1241 (1974)
5. Okumura, S., M. Iwai and Y. Tsujisaka: *Agr. Biol. Chem.*, **40**, 655 (1976)
6. JP 46-16509 (1971)
7. JP 46-28039 (1971)
8. Satoh, T., Y. Akaike, T. Funada and T. Okaki: *J. Jap. Chem. Soc.*, **9**, 1358 (1983)
9. Taylor, F., C.C. Panzer, J.C. Craig, Jr. and D.J. O'Brien: *Biotech. Bioeng.*, **28**, 1318 (1986)
10. Hoq, M.M., T. Yamane, S. Shimizu, T. Funada and S. Ishida: *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **61**, 776 (1984)
11. Hoq, M.M., H. Tagami, T. Yamane, S. Shimizu: *Agr. Biol. Chem.*, **49**, 335 (1984)
12. Higgins, D.M. and D.M. Skauen: *J. Phar. Sci.*, **61**, 1567 (1972)
13. Zayas, J.: *Biotech. Bioeng.*, **27**, 1223 (1985)
14. KS M2732, M5480 (1977)
15. Desnuelle, P.: *The Lipase, in the Enzymes*, **7**, 575 (1973)
16. Product Bulletin, Meito Sangyo (1985)
17. Fukumoto, J., M. Iwai and Y. Tsujisake: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **10**, 257 (1964)

(Received June 28, 1991)