

유기용매 내에서 중쇄지방질의 합성

권 대 영
이화학연구부

Abstract

Using 20 lipases from various microbial origins medium chain glycerides, namely, mono-, di-, and tri-caproyl glycerols from glycerol and capric acid were synthesized in isooctane. Enzyme reaction was performed at 0.35 M of capric acid, 0.025M of glycerol and the same mass of silica gel to remove water in 5ml of isooctane with 30mg of lyophilized lipase. Among 20 lipases, eleven lipases showed good synthetic activities, especially lipase from *Pseudomonas aeruginosa* (Lipase PS), *Rhizomucor miehei* originated lipase and *Chromobacterium viscosum* lipase (Lipase CV) showed good activities for production of tricaprolylglycerol, while Lipase OF-360 (originated from *Candida rugosa*) and Lipase D (*Rhizopus delemar*) were good for production of dicaprolylglycerol. The lipases, especially Lipase PS, have high thermal stability at 60°C, and optimum pH of lyophilization for dehydrating the lipase was pH 6.5.

I. 서 론

중쇄지방질(medium chain triglyceride : 이하 MCT)는 구성지방산의 탄소수가 10개 이하인 capric acid, caprylic acid를 중심으로 된 트리글리세리드(triglyceride)를 일컫는다. MCT는 상온에서 액체상이고, 무색이며 순한 맛과 향을 가지고 있다. 낮은 점도 (20°C에서 25-31 c.p.), 낮은 표면장력, 낮은 응고점 및 좋은 전연성을 가지며, 특히 상화 안정성이 매우 높다(1). 이 특성외에 MCT가 다른 일반적인 유지와 현저히 다른 점은

체내에서 소화흡수되는 대사 경로가 장쇄지방(long chain triglyceride; LCT)과는 달리 간에서 산화되어 에너지원으로써만 이용될뿐 체내에 저장되지 않는 장점이 있다. 또한 문맥혈을 통하여 장내로 흡수되므로 장내흡수율이 LCT보다 4배나 빠르다(2).

이와같은 장점들 때문에 MCT는 지질대사의 이상, 소화기관의 이상에 따른 지방흡수 불량 및 결핍환자들에게 특수 영양식으로 공급되며, 미숙아나 유아의 영양제로 이용되고 있다(3). 또 vitamin이나 인지질 등의 지용성 영양소나 의약품의 용매 및

색소 방향의 carrier로 이용되고 있다(4, 5). 최근에는 버터나 치즈 등을 선호하는 환자들을 위하여 MCT 치즈가 개발되었다(6). 이와같은 이유로 MCT는 다양한 용도로 이용되고 있고 그 수요도 앞으로 증가될 것으로 전망되고 있다. 이에 따른 MCT에 대한 연구가 증가되고 있으며, 그 중요성도 높아지고 있다.

생체내에서의 지방의 합성 mechanism에 관한 연구는 많이 되어 있다. 그러나 생체내에서 중쇄지방질을 인위적으로 조절하여 대량으로 생산할 수 있는 기술을 개발한다는 것은 현재로서는 불가능하다. 따라서 생체밖에서 MCT를 생산할 수 밖에 없지만, 생체외에서의 트리글리세리드의 합성에 관하여는 연구가 거의 되어 있지 않다(7). 리파제(lipase)를 이용하여 장쇄지방질(트리글리세리드, 디글리세리드, 모노글리세리드)의 합성에 관하여는 보고된바 있다(8).

중쇄지방질을 체외에서 합성하려면 화학합성이나 생물학적 합성 방법이 있다. 그러나 화학합성으로는 아직까지 거대분자의 합성에까지는 이르지 못하고 있다. 효소등을 이용한 생물학적 합성은 안전성, 반응 특이성, 지방의 분리의 장점 등으로 효소적인 방법이 부각되고 있다. 중쇄지방산과 글리세롤로부터 합성하기 때문에 우선 중쇄지방산이 많이 필요하다. 본 연구팀은 이미 초임계유체추출장치(supercritical fluid extractor)를 이용하여 코코넛기름에서 중쇄지방산을 농축하였다(9). 또한 중쇄지방의 합성반응은 축합반응이므로 반응산물인 물의 양이 절대적으로 중요하다. 물이 있으면 반응평형이 합성 쪽으로 가지 않고 분해 반응으로 쪽으로 진행됨으로 물의 양을 줄이는 것이 절대적으로 중요하다. 따라서 본 연구에서의 반응시스템은 물이 거의 없는 유기용매내 반응이 중쇄지방질의 합성에 가장 적합한 반응계이다(10).

여기서 20 종류의 리파제를 이용하여 유기용매내에서 중쇄지방산인 capric acid와 글리세롤로부터 중쇄지방질을 합성하고자 가장 적합한 리파제를 선택하였으며, 선택된 리파제를 중심으로 반응 조건의 최적화, 합성 반응의 패턴, 반응기작에 대해

보고하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 효 소

20 종류의 리파제의 종류 및 기원, 공급처는 다음과 같다. 13종류, 즉, Lipase CES (*Pseudomonas* sp), Lipase AY (*Candida rugosa*), Lipase AP-10 (*Aspergillus niger*), Lipase GT-20 (*Penicillium cyclopium*), Lipase GC (*Geotrichum candidum*), Lipase AP (*Aspergillus niger*), Lipase PS (*Pseudomonas aeruginosa*), Lipase L (*Candida lipolytica*), Lipase F-AP 15 (*Rhizopus javanicus*), Lipase R (*Penicillium roqueforti*), Lipase D (*Rhizopus delemar*), Lipase CE (*Humicola lanuginosa*), 및 Lipase G (*Penicillium cyclopium*)는 Amano Enzyme Co. (Nagoya, Japan)로 부터 공급 받았다. 두종류의 리파제; *Candida cylindracea* lipase와 Pancreatic lipase는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, U.S.A)로 부터 샀으며, *Rhizomucor miehei* lipase와 이 리파제의 고정화 효소인 Lipozyme는 Novo Enzyme Co. (Bagsbaerd, Denmark)로 부터 샀다. 또한 Lipase MY와 Lipase OF-360(*Candida rugosa*)는 Meito Sankyo (Osaka, Japan)로 부터, Lipase CV(*Chromobacterium viscosum*)는 Toyo Jozo(Shizuoka, Japan)로 부터 공급받았다.

2. 실험재료

표준물질로 중쇄지방산, capric acid(decanoic acid)와 모노글리세리드인 monocaproylglycerol(monocaprin), 디글리세리드인 dicaproylglycerol(dicaprin), 트리글리세리드인 tricaproylglycerol(tricaprin)을 반응기질과 반응산물의 동정과 정량에 사용하였으며 이들은 모두 Sigma사로부터 구입하였다. 기질중 하나로 쓰이는 글리세롤은 분자

생물학시약급으로 Kodak International Biotechnologies Inc.(New Haven, CT, U.S.A)로 부터 구입하였다. 글리세롤의 수분의 함량은 Karl Fisher 방법인 Dosimat 665(Metrohm Co., Swiss)으로 재 결과 0.06% (w/w)이었다. 반응 유기용매인, heptane, octane, cyclohexane, 및 isooctane (2,2,4-trimethylpentane)은 spectrophotometry 급으로 Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI, U.S.A)에서 샀으며, 다른 유기용매인 hexane, pentane은 특급시약으로 사용하였다. HPLC용매인 acetonitrile과 isopropyl alcohol(2-propanol)은 HPLC급 시약으로 사용하였다. 유기용매의 물을 제거하기 위한 molecular sieve (3A)와 실리카 젤인 Wakogel C-300 (230-400 mesh)는 Wako Chemical Co., Osaka, Japan)을 사용하였다.

3. 효소반응시스템

리포제에 있는 수분을 제거하기 위하여 리포제 (약 500mg)을 500ml의 0.01M 인산완충용액 (phosphate buffer solution; pH 7.0)에 용해시킨 후 동결건조하였다. MCT를 합성하기 위하여 30mg의 리포제(30mg/5ml)를 0.35M의 capric acid와 0.025M의 글리세롤이 녹아있는 5ml의 isooctane 등(11) 유기용매 용액에 넣어서 반응시켰다(8). 이 때 Wakogel을 글리세롤과 같은량(약 0.46g; 5ml의 isooctane인 경우)을 넣어 발생한 물을 제거하였으며 molecular sieve를 미리 유기용매내에 넣어 역시 물을 제거하였다(10). 반응 vial은 반응시키기 전에 5% dichlorodimethylsilane 톨루엔 용액에서 실란화(silanization)시켜 높은 점도(111 cps 이상, 12)에 의한 글리세롤의 표면장력을 감소시켜 사용하였다(8, 13). 반응혼합물을 10sec 동안 sonication한 후, 반응 vial을 25°C로 조절되고 있는 마그네틱교반기(submerged magnetic stirrer; 500 rpm, VarioMag Telemodule 20P)로 교반하면서 반응시켰다. 반응 중간에 일정한 시간별로 반응용액을 HPLC시린지로 4 μ l 취하여 HPLC로 capric acid, mono-, di-

- 및 tri-caprin의 함량을 정량하였다.

4. 리포제 활성도 분석

리포제의 활성도는 생성된 반응산물인 mono-, di-와 tri-caprin의 함량을 분석용 HPLC(Waters, U.S.A)로 분석하였다. 사용된 칼럼은 역상칼럼인 Novapak C₁₈column(8mm ID \times 10cm, 4 μ m)을 사용하였으며 분석조건의 유동용매는 acetonitrile : 2-propanol : acetic acid = 15 : 15 : 1(v/v)를 사용하였다(14). 분석조건은 다음과 같다. 용매의 속도는 isocratic 조건으로 0.5ml/min이며, 나타난 피크는 RI detector(Waters Model 401 Differential Refractometer, 16 attenuation)로 검출하였으며 각 피크에 대한 면적은 Waters Data Module(Model 745, 16 attenuation)로 계산하였다. 합성된 각각의 반응산물은 표준품을 사용하여 얻은 10mM과 250mM사이의 표준곡선에서 정량하였다.

5. 리포제의 pH와 온도에 따른 반응 활성도 변화

리포제의 동결건조 pH에 따른 리포제의 MCT 합성 활성도를 조사하기 위하여 각기 다른 패턴을 갖는 3 종류의 리포제를 동결건조 시킬 때 pH 3, 4, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 8, 9에 해당하는 완충용액(0.05M)을 제조하였다. pH 3, 4, 5는 citrate buffer, pH 4, 5, 5.5은 succinate buffer, pH 6, 6.5, 7, 8은 phosphate buffer, pH 8, 9는 tris buffer, pH 9, 10는 histidin buffer를 사용하였다. 동결건조 후 염을 제거하기 위하여 acetonitrile로 세척하였다. 효소양을 같게 하기 위하여 Lowry 방법(15)에 따라 정량하였다. 온도에 대한 영향을 조사하기 위하여는 온도를 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80로 조절한 후 각각의 온도에서 PS 리포제를 이용하여 리포제의 활성도를 조사하였다. 높은 온도에서 휘발되는 것을 막기 위하여 isooctane을 사용하였으며 봉합을 철저히 하였다.

III. 결과 및 고찰

표준품, capric acid, monocaprin, dicaprin, tricaprin의 각각의 농도(20mM에서 250mM 까지)에 대한 표준곡선은 그림1과 그림 2와 같았다. 이 때 injection양은 4 μ l이다. Monocaprin은 피

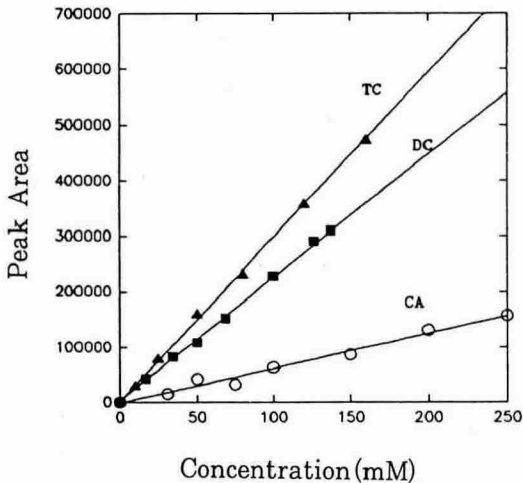


그림 1. 표준품 capric acid, dicaprin, tricaprin의 표준곡선

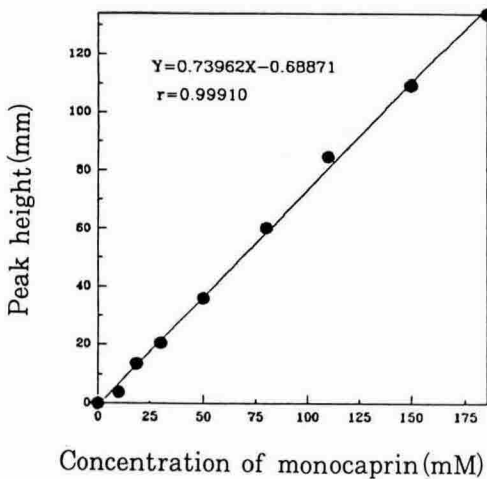


그림 2. 표준품 monocaprin 표준곡선

크면적이 피크형태에 따라 각기 다르게 계산됨으로 피크높이로 계산하여 표준곡선을 따로 그림 2에 나타냈다. Monocaprin의 표준직선의 회귀식은 Y (mm, peak height) = $0.740 \times X$ (mM, concentration) - 0.689이며, capric acid, dicaprin, tricaprin의 회귀식은, 각각 $Y = 0.632 X - 1.80$, $Y = 2220.7 X + 3.29$, $Y = 2966.8 X + 1368.4$ 이다. 여기서 X 는 농도(mM)이고 Y 는 피크면적(electron intensity)이다.

Isooctane내에서 20종류의 리파제에 대한 증쇄 지방합성 반응활성도를 예비적으로 측정된 결과를 표 1에 나타냈다. 표의 결과에서 나타낸 바와 같이 일단 리파제 PS, D, CC, MY, *Rhizopus miehei*, OF-360, CV, 및 AP가 높은 합성활성도를 나타냈다. 반면 리파제 R, 췌장리파제, 리파제 CES, L은 거의 활성도를 나타내지 않았다. 그리고 나머지 리파제들은 약간의 반응활성도를 나타냈다. 따라서 본 실험에서는 리파제 F-AP15, PS, D, CC, MY, *Rhizopus miehei*, OF-360, CV, 및 AP와 같은 높은 합성활성도를 나타내는 9종류의 리파제에 대하여 반응시간에 따른 증쇄지방질의 합성에 관하여 자세히 조사하였다. 일반적으로 반응시간

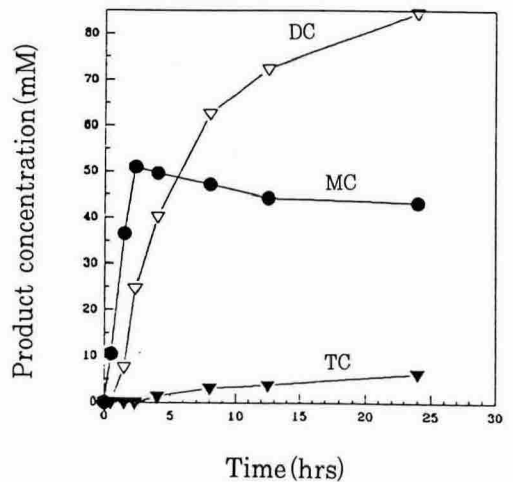


그림 3. 유기용매내에서 리파제에 의한 MCT 합성 패턴 I (*Candida cylindracea*)

표 1. 20종류의 리파제에 대한 MCT합성 활성도

| Lipase | Products | Monocaprin | | Dicaprin | | Tricaprin | |
|---------------------------------------|------------------|-------------|------|----------|-------|-----------|-------|
| | Reaction time(h) | 2 | 18 | 2 | 18 | 2 | 18 |
| F-AP15(<i>Rhizopus javanicus</i>) | | + | + | ++ | +++ | + | ++ |
| R(<i>Penicilium roquerforti</i>) | | - | - | - | - | - | - |
| PS(<i>Pseudomonas aeruginosa</i>) | | + | + | ++ | ++++ | + | ++++ |
| D(<i>Rhizopus delemar</i>) | | + | + | + | ++++ | + | + |
| Pancreatic lipase | | - | - | - | - | - | - |
| CE(<i>Humicola lanuginosa</i>) | | tr | + | tr | + | tr | + |
| G(<i>Penicilium sp</i>) | | + | ++ | + | ++ | - | - |
| G(<i>Penicilium javanicus</i>) | | + | ++ | + | ++ | tr | + |
| CC(<i>Candida cylindracea</i>) | | + | + | +++ | ++++ | +++++ | +++++ |
| Lipase MY | | tr | + | + | +++ | ++ | ++++ |
| <i>Rhizomucor miehei</i> | | ++ | + | +++++ | ++++ | ++ | +++++ |
| OF-360(<i>Candida rugosa</i>) | | ++++ | ++++ | +++ | +++++ | + | + |
| CV(<i>Chromobacterium viscosum</i>) | | ++ | + | +++ | +++ | tr | +++++ |
| CES(<i>Pseudomonas sp</i>) | | - | - | - | - | + | - |
| L(<i>Candida lipolytica</i>) | | - | - | - | - | - | - |
| AY(<i>Candida rugosa</i>) | | + | ++ | +++ | +++ | + | ++ |
| GC(<i>Geotricum candidum</i>) | | + | + | + | ++ | + | +++ |
| AP(<i>Aspergillus niger</i>) | | + | ++ | + | ++++ | + | ++++ |
| M-AP10(<i>Aspergillus niger</i>) | | tr | + | + | +++ | tr | ++ |
| GT-20(<i>Penicilium cyclopium</i>) | | tr | + | tr | + | tr | tr |
| + | Peak area | 0-10000 | | | | | |
| ++ | Peak area | 10000-20000 | | | | | |
| +++ | Peak area | 20000-35000 | | | | | |
| ++++ | Peak area | 35000-50000 | | | | | |
| +++++ | Peak area | 50000-65000 | | | | | |
| +++++ | Peak area | over-65000 | | | | | |

0.5, 1, 2, 3, 5, 8, 12, 24시간에 반응산물을 측정하였다. 이들의 합성 반응 패턴을 자세히 조사한 결과 크게 분류하면 세가지 패턴을 나타냈다. 첫째로 CC 리파제(*Candida cylindracea*)로 대표되는 리파제로 처음에 dicaprin과 monocaprin이 급격히 형성되다가 곧 monocaprin이 dicaprin으로 변환되어가지만 dicaprin에서 tricaprin으로는 쉽게

변환되지 않은 형태로 tricaprin은 조금씩 천천히 생성된다(그림 3). 이런 형태를 나타내는 리파제는 CC, MY, OF-360이 이러한 패턴에 해당된다. 두번째로 *Rhizomucor miehei*로 대표되는 리파제로 처음에는 monocaprin 및 dicaprin이 급속히 생성되다가 생성된 monocaprin은 dicaprin으로 다시 dicaprin은 tricaprin으로 급속히 변환되어 결국

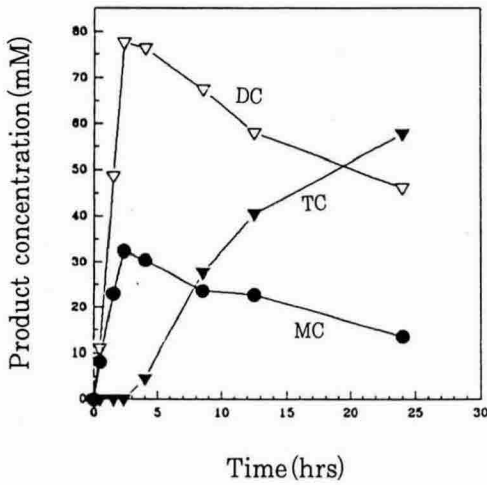


그림 4. 용기용매내에서 리파제에 의한 MCT 합성 패턴 II (*Rhizomucor niger*)

일정시간이 지나면 tricaprin이 대량 생성되는 형태이다(그림 4). 여기에는 PS, CV 리파제가 속한다. 마지막으로 AP(*Aspergillus niger*)와 같은 리파제는 monocaprin, dicaprin, tricaprin이 상대의

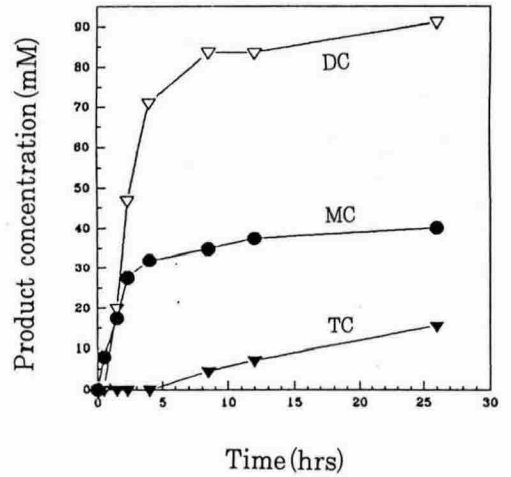


그림 5. 용기용매내에서 리파제에 의한 MCT 합성 패턴 III (*Aspergillus niger*)

농도에 관계없이 독립적으로 꾸준히 증가되는 패턴이다(그림 5). 이러한 리파제에 속한 것은 F-AP15, D 리파제이다.

이와 같이 리파제 별로 합성 반응이 다른 것은

표 2. 각종 lipase의 트리글리세리드 분해반응 specificity 비교

| Origin | Specificity | |
|--------------------------------|-------------|----------------------------|
| | Position | Fatty acids |
| <i>Rhizopus arrhizus</i> | 1,3 | none |
| <i>delemar</i> | 1,3 | CCC |
| <i>niveus</i> | 1,3 | medium-long |
| <i>Rhizomucor miehei</i> | 1,3 | medium-long |
| <i>Pseudomonas cyclopium</i> | 1,3 | CCC |
| <i>Aspergillus niger</i> | 1,3 | C |
| <i>Penicillium roquerforti</i> | 1,3 | short chain |
| <i>cyclopium A</i> | 1,3 | short chain |
| <i>cyclopium G</i> | 1,3 | MG>DG>>TG medium>S or L |
| <i>Humicola lanuginosa</i> | 1,3 | none |
| <i>Candida cylindracea</i> | none | none |
| <i>lipolytica</i> | none | medium-long |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> | none | none |

리포제의 기질에 반응 특이성의 차이로 볼 수 있다. 현재까지 리포제의 트리글리세리드에 대한 반응 특이성은 잘 알려져 있지만(표 3), 합성반응에 대한 반응 특이성은 잘 알려져 있지 않다.

앞의 실험의 결과 첫번째 패턴에 해당하는 리포제는 대부분 분해반응에서는 기질특이성이 없는 것으로 트리글리세리드의 아무 위치에서나 지방산을 잘 잘라준다. 그러나 유기용매내에서 합성 반응에서는 dicaprin에서 tricaprin으로 진행하는 데 rate limiting이 걸리고 있다. 두번째 패턴에 해당하는 리포제는 분해반응시 트리글리세리드나 diglyceride의 *sn*-1,3의 지방산을 우선적으로 잘라주고 *sn*-2-monoglyceride는 isomerization에 의하여 *sn*-1 또는 *sn*-3-monoglyceride로 바꾼 다음 리포제에 의하여 분해시키는 기질 특이성을 말한다. 그러나 유기용매내에서의 합성 반응에서는 monocaprin과 dicaprin이 생성된 후 tricaprin으로 가는 데는 그리 어렵지 않다. 마지막 패턴을 나타내는 리포제의 분해특이성은 *sn*-1,3 특이성을 갖지만 유기용매내에서의 합성반응은 mono-, di-, tricaprin에 전혀 특이성이 전혀 없는 것처럼 나타나고 있다. 이러한 현상에 대하여 현재까지 정확한 원인이 밝혀지고 있지 않다. 대체적으로 볼 때 수용액에서의 분해반응과 유기용매내에서 합성반응과 기질 및 위치 특이성이 관련이 있는 것으로 보여지나, 첫번째 패턴의 경우 분해반응에서는 위치 특이성이 없으나 반응상수 mono-, dicaprin 별로 반응상수가 차이가 남을 보여주고 있고, 세번째 패턴의 경우는 이와는 반대 현상이 나타나고 있다. 이에 대하여 앞으로 연구가 더 필요할 것으로 본다. 아무튼 합성반응 기작과 위치 및 기질 특이성을 분해반응과 연관지어 연구하면 좋은 결과를 보여줄 것으로 본다.

여러가지 유기용매에 내에서 반응활성도의 차이와 반응 패턴의 차이가 있는지를 확인하기 위하여 반응 유기용매인, heptane, octane, cyclohexane, hexane 및 isooctane 에 대하여 앞에서 반응 패턴에 따라 대표되는 3가지의 리포제, 즉 *Candida rugosa*, *Rhizopus javanicus*, *Rhizomucor miehei*를 가지고 반응물 생성율(conversion yield) 및 각각

의 반응물 생성 패턴을 조사하였다(표 3와 그림 6). 반응조건; capric acid, 0.3g/5ml(350mM); glycerol, 0.46g/5ml; silica gel, 0.46g/5ml; lipase, 30mg/5ml이다. Hexane에서의 반응 패턴은 isooctane에서의 반응패턴과는 차이가 있었으며(그림 6), 다른 유기용매의 종류에 따라 각각의 리포제의 반응패턴의 변화는 없었다(다른 종류의 리포제와 유기용매의 데이터는 나타내지 않았음). 다만 리포제 OF에서 hexane에서는 tricaprin이 isooctane에서는 dicaprin이 상대적으로 많이 합성하는 것으로 나타났다. 이는 유기용매 종류에 따라 리포제의 반응 특이성이 변화되지 않는다는 사실을 증명하고 있다. 여러 유기용매 중 hexane이 가장 강한 활성도를 나타냈으며 다음으로 isooctane이 강한 활성도를 나타냈다. 그러나 hexane은 강한 휘발성 때문에 반응중에 쉽게 증발되기 때문에 반응을 조절하기가 쉽지 않았다. 실제로 hexane은 매시간 당 약 1%(v/v) 정도가 증발되어갔다. 따라서 본 실험에서는 hexane 대신 isooctane을 이용하여 실험을 계속하여 나갔다. 한편 conversion yield를 높이기 위하여는 hexane을 사용하여야 함으로 이 경우 hexane의 증발을 막기위한 reactor 등 반응기의 개발이 필요하다.

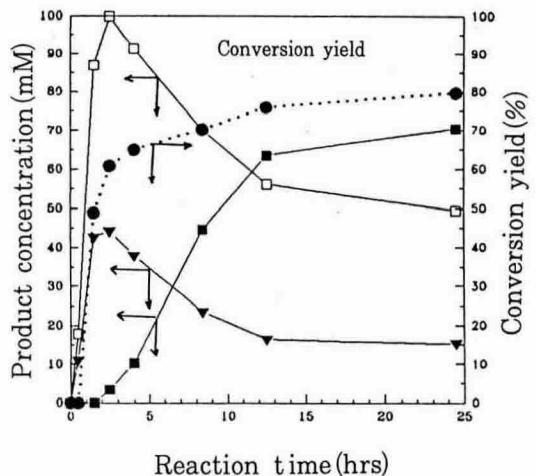


그림 6. Hexane에서의 리포제의 MCT합성 반응 (*Rhizomucor miehei*)

표 3. 유기용매에 capric acid에 대한 리파제 (*Candida rugosa*)의 합성반응 활성도

| Solvent | Product Time(h) | Monocaprin (MC) | Dicaprin (DC) | Tricaprin (TC) | Conversion Yield(%) |
|--------------|-----------------|-----------------|---------------|----------------|---------------------|
| Cyclo-hexane | 0.5 | 18.85 | 3.90 | - | 7.60 |
| | 1.5 | 31.81 | 30.08 | 2.81 | 19.68 |
| | 3 | 26.46 | 64.71 | 9.54 | 48.58 |
| | 5 | 22.84 | 72.67 | 15.97 | 58.96 |
| | 8 | 21.93 | 74.98 | 23.22 | 63.76 |
| | 14.5 | 19.42 | 67.95 | 31.75 | 68.30 |
| | 24 | 18.14 | 63.39 | 38.13 | 73.59 |
| Heptane | 0.5 | 16.75 | 1.90 | - | 5.80 |
| | 1.5 | 37.19 | 24.48 | 1.85 | 21.34 |
| | 3 | 36.38 | 48.83 | 4.83 | 38.81 |
| | 5 | 34.84 | 61.95 | 6.92 | 46.43 |
| | 8 | 36.15 | 71.59 | 7.97 | 52.74 |
| | 14.5 | 32.49 | 83.04 | 10.41 | 58.60 |
| | 24 | 38.74 | 78.50 | 12.56 | 67.61 |
| Octane | 0.5 | 20.83 | 9.37 | - | 11.30 |
| | 1.5 | 35.46 | 30.68 | 1.31 | 25.96 |
| | 3 | 36.22 | 53.95 | 3.62 | 37.30 |
| | 5 | 31.75 | 65.21 | 3.99 | 47.59 |
| | 8 | 30.80 | 77.28 | 6.93 | 54.69 |
| | 14.5 | 27.36 | 81.05 | 11.47 | 62.03 |
| | 24 | 25.06 | 75.59 | 18.34 | 65.89 |
| Hexane | 0.5 | 20.76 | 11.25 | - | 12.36 |
| | 1.5 | 19.04 | 51.17 | 10.71 | 35.91 |
| | 3 | 12.82 | 43.19 | 32.90 | 4.07 |
| | 5 | 9.59 | 33.57 | 43.93 | 65.87 |
| | 8 | 9.19 | 34.06 | 52.22 | 69.47 |
| | 14.5 | 8.31 | 32.11 | 50.59 | 75.64 |
| | 24 | 7.29 | 29.80 | 47.62 | 81.64 |
| Isooctane | 0.5 | 28.17 | 7.09 | - | 12.10 |
| | 1.5 | 39.47 | 39.88 | 1.36 | 34.88 |
| | 3 | 38.04 | 62.17 | 3.63 | 46.23 |
| | 5 | 34.57 | 74.96 | 5.87 | 54.33 |
| | 8 | 32.49 | 81.82 | 9.65 | 61.85 |
| | 14.5 | 27.85 | 75.82 | 17.70 | 68.71 |
| | 24 | 24.43 | 72.14 | 27.67 | 73.04 |

$$\text{Conversion Yield(\%)} = \frac{(\text{MC} \times 1) + (\text{DC} \times 2) + (\text{TC} \times 3)}{\text{CA}(350\text{mM})} \times 100$$

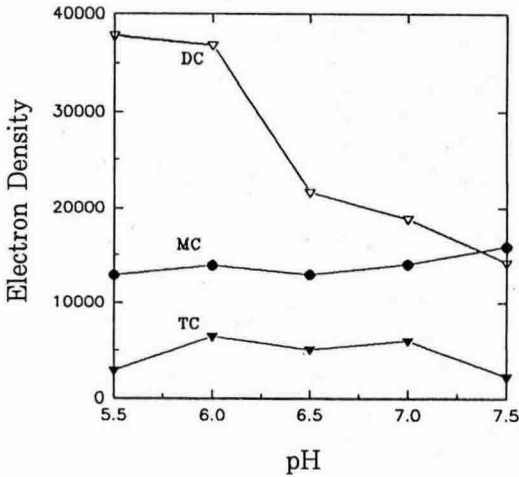


그림 7. 리파제의 동결건조 pH에 대한 리파제의 반응활성도 변화

리파제의 동결건조 pH에 따라 효소의 활성도를 조사한 결과 낮은 pH(pH 3, 4, 5)와 높은 pH(pH 8, 9, 10)에서는 전혀 반응이 일어나지 않았으며, pH 6.5에서 가장 높은 활성도를 나타냈다. 일반적으로 수용액상에서 리파제의 최적 pH는 6-7정도이다(16). 본 실험의 결과(그림 7)는 동결건조의 pH가 수용액상의 리파제의 최적 pH와 일치함을 보여주고 있다. 또한 낮은 pH나 높은 pH에서 동결건조할 경우 효소의 3차구조가 변형되어 그대로 동결건조된 후 유기용매내에서 반응시에도 conformation이 전혀 변하지 않기 때문에 효소활성도가 나타나지 않는 것으로 나타났다. 즉 어느 pH에서 동결건조할 경우 동결건조 바로전의 conformation이 동결건조후, 유기용매내에서도 그대로 유지된다는 pH 기억이론(pH memory theory)과 일치함을 보여주고 있다(17). 온도에 대한 영향을 조사한 결과(그림 8)도 같은 이론, 즉 효소가 유기용매내에서는 매우 rigid하여 구조가 쉽게 변하지 않는다는 이론을 뒷받침한다. F-AP15 리파제의 경우 반응온도 40, 60°C에서도 초기반응속도가 차례로 증가하여 60°C의 경우는 실온에서 보다 반응속도가 두배 증가함을 보여주고 있다.

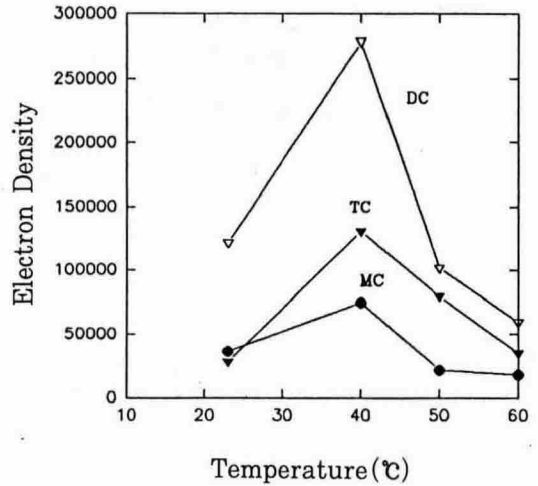


그림 8. 반응 온도에 따른 리파제의 합성 반응 활성도 변화

보통 리파제가 50°C 또는 60°C 에서 1시간 이내에 활성도가 거의 다 파괴되는 경우(16)를 생각하면 유기용매내에서 리파제의 열안정은 매우 증가된다. 실제로 리파제가 denaturation될 때 물분자가 크게 작용하여 먼저 H-bond가 끊어지면서 파괴된다(18). 그러나 물분자가 거의 없는 유기용매내에서는 리파제가 열에 매우 강하여 60-70°C에서도 강한 반응활성도를 나타낸다. 그러나 효소반응시간이 6-7시간 지나면 생성된 물 등 다른 원인에 의하여 효소가 서서히 denaturation됨을 보여주고 있다. 물론 물이 없는 상태에서 리파제를 120°C 등 고온에서 저장할 경우 크게 파괴되지 않는다(19).

참고 문헌

1. Megremis, C.J., Medium chain triglycerides: A Conventional Fat, Food Technology, 45, 108 (1991)
2. Votik, A.J., The British J. Clinical Practice, 29, 55 (1975)
3. Farrell, P.M., Mischeler, E.H., Sondel, S.A.

- and Palta, M., J. Am. Dietetic Asso. 87, 1353 (1987)
4. Sanyu. S., Jap. Patent 049747 (1985)
 5. Snow Brand Milk Products, Jap. Patent 185922 (1989)
 6. Babayau, V.K. and Rosenau, J.R. Food Technol. 45, 111 (1991)
 7. Rhee, J.S., Production of Medium Chain Triglyceride (MCT) Oil using Lipase, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Seoul (1989)
 8. Kwon, S.J., Kang, S.T., Han, J.J., Lee, Y.P., Lee, S.Y., Kim, M.K., Ham, D.H. and Rhee, J.S., Reactor Design for Enzymatic Production of Surfactans and Monoglycerides, National Citizen Bank, Seoul (1992)
 9. Song, H.N., Kwon, D.Y. and Yoon, S.H., Concentration of Medium Chain fatty Acids using Super Critical Fluid Extractor, Korea Food Research Institute, Seoul (1993)
 10. Kwon, D.Y., J. Korean Chem. Soc. 36, 125 (1992)
 11. Kim, K.H., Kwon, D.Y. and Rhee, J.S., Lipids 19, 975 (1984)
 12. Budavari, S., The Merck Index. An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. 11th edn, Merck & Co., Inc. Rahway(N.J.), p 8384 (1989)
 13. Cooper, T.G., The Tools of Biochemistry. John Wiley & Sons, New York, pp 189 (1977)
 14. Kim, S.M. and Rhee, J.S., J. Am. Oil Chem. Soc. 68, 499 (1991)
 15. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J., J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)
 16. Kwon, D.Y., Kim, K.H. and Rhee, J.S., Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng. 15, 43 (1986)
 17. Zaks, A. and Klivanov, A.M., J. Biol. Chem. 263, 8017 (1988)
 18. Zaks, A. and Klivanov, A.M., J. Biol. Chem. 263, 3194 (1988)
 19. Klivanov, A., Chemtech 16, 354 (1986)
-