한국생물공학회지 제 13권 제 1호
Korean J. Biotechnol. Bioeng.
Vol. 13, No. 1, 90-95(1998)

리파제의 아실 체인 특이성을 이용한 물고기 기름에서 n-3 다중불포화지방산의 농축공정개발

진 영 서 · † 허 병 기
인하대학교 공과대학교 화공 · 고분자 · 생물공학부
(접수 : 1997. 10. 7., 게재승인 : 1997. 10. 28.)

Process Development of Concentration of n-3 PUFAs from Fish Oil by Means of Lipase

Young-Suh Jin and Byung-Ki Hur†
School of Chemical, Polymer, and Biological Engineering, Inha University, Inchon 402-751, Korea
(Received : 1997. 10. 7., Accepted : 1997. 10. 28.)

Experiments on the process development for the concentration of polyunsaturated fatty acid (PUFAs) such as eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) from fish oil by using acyl chain specificity of *Candida cylindracea* lipase were performed. Five kinds of oils were hydrolyzed with *Candida cylindracea* lipase. Among them, *Candida cylindracea* lipase just had low activity on the PUFAs-rich fish oil. After the hydrolysis of fish oil, free fatty acid was removed and fatty acid components of glyceride mixtures were analyzed. When the hydrolysis was about 70%, the DHA content in the glyceride mixture was about three times more than that in the original fish oil. The EPA and stearidonic acid contents in the glyceride mixtures, however, were similar to that of the original fish oil. In this work, these results showed that the cocenration process of PUFAs by using the acyl chain specificity of *Candida cylindracea* lipase was effective in producing glycerides that contained a high concentration of PUFAs in good yield.

Key Words : *Candida cylindracea* lipase, acyl chain specificity, polyunsaturated fatty acids(PUFAs), docosahexaenoic acid(DHA), eicosapentaenoic acid(EPA)

서 론

Eicosapentaenoic acid (EPA)와 docosahexaenoic acid (DHA)같은 다중불포화지방산(PUFAs)의 n-3족은 그것들의 임상학적 효과 때문에 관심의 초점이 되어왔다. 특히 DHA는 망막과 뇌를 구성하고 있는 인지질의 주요성분으로 중추신경계의 필수물질로 알려져있다. 인간은 체내에서 자체적으로 DHA를 합성할 수 없기 때문에 천연물 특히 해산물로부터 DHA를 섭취해야한다. 해산물 중 10-30%의 n-3족 다중불포화지방산을 포함하는 물고기기름이 DHA 섭취의 가장 중요한 재원이다(1). 사슬의 길이가 긴 n-3족의 다중불포화지방산은 매우 불안정하여, 가열하거나 공기와 접촉하게 되면 산화반응, 시스-트랜스 이성화반응 및 이중결합의 전이반응 등이 쉽게 발생되어 다중불포화지방산의 시스 n-3구조가 대부분 파괴된다(2). 이러한 측면에서 볼 때 다양한 종류의 지방산으로 구성되어 있는 물고기기름으로부터 다중불포화지방산을 분리 또는 농축하는 공정에 고온을 필요로 하는 전통적인 화학공정을 적용하는 것은 많은 문제점을 유발시킬 수 있다. 이에 반하여 생체촉매인 효소를 이용하는 농축공정은 운전조건이 상온 및 상압이므로 다중불포화지방산의 cis n-3구조를 자연상태로 보존할 수 있다는 장점을 지니고 있다(3). 따라서 n-3족 다중불포화지방산중 변성이 특히 쉬운 DHA와 EPA의 농축공정에 있어서 온화한 운전조건의 효소적 접근방식은 여러 이점이 있다고 기대되어질 수 있다. 효소의 가장 중요한 특징은 기질에 대한 선택성과 온화한 운전조건에서 촉매효율과 활성도가 높다는 것이다.

지질의 가수분해효소인 리파제는 두 가지의 반응특이성을 가지고 있는데 하나는 반응 위치 특이성(positional specificity)이고 다른 하나는 아실 체인 특이성(acyl chain specificity)이다(1). 반응 위치 특이성을 나타내는 리파제는 *Rhizopus javanicus* lipase(4), *Rhizopus niveus* lipase(5), *Aspergillus niger* lipase(1) 등이 알려져 있으며, 아실 체인 특이성을 지니고 있는

† Corresponding Author : Department of Biological Engineering, Inha University, Inchon 402-751, Korea
Tel : 032-860-7512, Fax : 032-875-0827
E-mail : biosys@dragon.inha.ac.kr

리파제는 *Mucor miehei* lipase(8), *Candida cylindracea* lipase, *Rhizopus arrhizus* lipase(9)등이 알려져 있다. 리파제의 반응 위치 특이성을 이용한 DHA와 EPA의 농축공정연구에서 V. B. Yadwad(5)는 다중불포화지방산이 주로 글리세라이드의 2번 자리에 위치한다는 점을 이용하여 글리세라이드의 1번, 3번 위치의 아실기를 특이적으로 인식하여 활성을 가지는 리파제를 농축공정에 이용하여 최종반응혼합물내의 모노글리세라이드에서 DHA와 EPA의 함량을 각각 20.08%, 8.30%로 농축하였다. 리파제의 아실 체인 특이성을 이용한 DHA와 EPA의 농축공정연구에서 Yuji Shimada(10)와 Yukihisa Tanaka(1)는 아실기의 탄소수와 특정 위치의 이중결합에 따라 활성을 달리하는 리파제를 이용하여 최종 반응 혼합물내의 DHA의 함량을 약 20-30%정도로 농축시킨 결과를 보고하였다. 그러나 이러한 리파제의 반응특이성을 이용한 다중불포화지방산의 농축에 관한 연구들은 최종반응혼합물내에서 다중불포화지방산을 많이 포함하는 글리세라이드혼합물을 효과적으로 분리해야하는 문제점을 내포하고 있을 뿐만 아니라 가수분해 시간에 따른 변화과정을 명확히 해석하지 못하고 있다. 따라서 본 연구에서는 아실 체인 특이성을 나타내는 *Candida cylindracea* 유래의 Lipase-OF 360,000을 사용하여 물고기기름으로부터 DHA와 EPA를 농축하는 과정에서, 기질의 가수분해율, 트리글리세라이드 농도변화, 디글리세라이드 농도변화, 글리세라이드내의 각지방산 농도변화, DHA와 EPA의 농도변화를 가수분해시간의 함수로 규명함으로써 효소 리파제에 의한 DHA 및 EPA 농축공정설계에 기초자료를 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

Candida cylindracea 유래의 리파제를 사용하여 물고기기름을 가수분해시켰다. 기름과 물의 부피비를 1:1로 하고 반응온도 38℃, 교반속도 250 rpm으로 고정하여 가수분해반응을 진행시켰다. 반응 시간별로 시료를 취하여 100℃ 끓는 물에서 효소의 반응을 정지시킨 후 일부는 생성혼합물의 트리글리세라이드, 디글리세라이드, 모노그리세라이드 및 유리지방산의 조성을 확인하기 위하여 Thin Layer Chromatography (TLC)분석에 사용하였고, 나머지 시료는 탈산공정을 거친 후 미반응 트리글리세라이드, 디글리세라이드 및 모노그리세라이드의 지방산 구성 성분을 확인하기 위하여 가스크로마토그래프 분석에 사용하였다.

효 소 : 비특이적 리파제인 *Candida cylindracea*유래의 Lipase-OF 360,000을 일본 MEITO SANGYO社에서 구입했다. 이 리파제는 360,000 U/g의 매우 높은 활성을 갖고 있으며, 산성용액내에도 활성을 잃지 않는 특성을 지니고 있어 가수분해시 산 또는 알카리 등을 첨가 할 필요가 없다. 이 효소의 최적 반응온도는 30-40℃이다.

기 질 : 본 연구에서 기질로 사용한 물고기기름은 노르웨이 LIPRO AS社의 제품으로 정어리와 벤덴이류의 해양어류를 잘게 썰어 삶은 후 압착하여 원료유를 얻은 후 탈산, 진공건조, 냉각여과, 탈취등의 공정을 거쳐 얻은 것으로 EPA를 약 17%, DHA를 약 11%를 함유하고 있다.

탈산공정 : 한국공업규격(11)과 Yukihisa Tanaka의 방법(1)을 변형시켜 탈산공정을 수행하였다. 반응 시간별로 2 mL의 시료를 취하여 에펜도르프튜브에 주입한 후 100℃ 끓는물에 10분간 가열함으로써 효소의 활성을 정지시켰다. 3600 rpm에서 15분간 원심 분리하여 상을 분리한 후 기름 층에서 0.6 mL의 시료를 취하여 시험관에 주입한 후 아세톤과 핵산을 각각 3 mL씩 첨가하고 교반시켜 용해시켰다. 유리지방산을 제거하기 위하여 용해된 시료를 0.2 N NaOH 수용액 100 mL에 가한 후, 약 5분 가량 교반시키고 2시간 가량 정치시켰다. 상분리가 일어나면 하층은 제거하고 상층은 증류수로 여러번 세척하여 기름층 내의 잔여 NaOH를 제거시켰다. 유리지방산이 제거된 상층을 분리하여 용매를 증발시켜 가수분해 되지 않은 트리글리세라이드, 디글리세라이드 및 모노글리세라이드의 혼합건조시료를 얻었다.

에스테르화 반응 : Guy Lepage외 방법(12)을 변형시켜 사용하였다. 탈산공정을 거친 시료 400 mg에 아세틸클로라이드-메탄올 용액 3mL을 첨가한 후 질소하에서 100℃로 1시간 중탕가열하여 에스테르화반응을 시켰다. 중탕 가열 후 상온에서 냉각하고 핵산 6 mL를 첨가하여 60초동안 교반하였다. 여기에 증류수 3 mL를 첨가하고 30초동안 교반하면 용액은 두 상으로 분리된다. 아래 상은 아세틸클로라이드와 물 및 수용성물질의 혼합상이고 윗상은 메틸에스터 지방산이 용해되어있는 핵산용액이다. 이 핵산용액을 분리하여 가스크로마토그래프의 분석시료로 사용하였다

GC 분석 : Hewlette-Packard社의 HP 6890 series GC System을 사용하여 가수분해되지 않은 트리글리세라이드, 디글리세라이드 및 모노그리세라이드 혼합시료내의 지방산 조성을 분석하였다. 이때 사용한 Column은 HP 19091J-413이었으며 detector로는 FID를 사용하였다. 오븐의 온도는 150℃(2min)+7℃/min+265℃(2min)이었으며 detector의 온도는 300℃이었다.

TLC-FID 분 석 : 반응 시간 별로 채취한 시료를 100℃ 끓는 물에서 효소의 반응을 정지시킨 후 3600 rpm에서 15분간 원심분리하고, 기름층에서 100 μL의 시료를 취하여 10 mL의 클로로포름에 녹인 후 박층 크로마토 그래피(CHROMAROD-S III)에 시료 1 μL를 점적하여 100 mm의 높이로 전개하였다. 전개용매로는 부피비가 70:30:2인 벤젠, 클로로포름, 아세트산의 혼합물을 사용하였다. TLC-FID의 분석에서 수소 가스의 유속은 160 mL/min, 공기 유속은 2.0L/min으로 하였으며 scan speed는 30초로 하였다. 결과처리는 일본 IATRON社의 IATROCODER TC-21을 사용하였다.

결과 및 고찰

Lipase-OF의 아실 체인 특이성

Lipase-OF 360,000은 다중불포화지방산에 대해 아실 체인 특이성이 있다고 알려져 있다(5). 즉 유지가 가지고 있는 지방산의 종류에 따라 Lipase-OF 360,000의 활성이 달라진다. 본 연구에서는 5종류의 유지를 사용하여 가수분해를 진행시켰다. Table 1에 나타낸 바와 같이 주로 불포화도가 낮은 지방산들을 구성성분으로 하는 유지인 Beef Tallow, FAT, Palm Kernel, RBD+Beef Tallow(7:3)의 가수분해반응은 유지에 대한 Lipase-OF 360,000의 농도를 0.013wt%로하여 48시간 가수분해반응을 진행시켰고, 불포화도가 높은 지방산들을 다량 포함하는 물고기기름을 기질로 가수분해시킨 경우는 앞의 경우의 약 4배에 해당하는 0.05wt%로 효소를 첨가하여 48시간 가수분해시켰다. Figure 1에서 나타난 바와 같이 후자의 경우는 전자에 비해 4배에 해당되

Table 1. Composition of fatty acids of oils

지질 / 지방산	Beef Tallow	FAT	Palm Kernel	RBD	Fish Oil
Saturated fatty acdis(%)	53.38	42.94	79.74	64.08	23.40
Unsaturated fatty acids(%)	46.62	57.06	20.26	35.92	29.19
n-3 Polyunsaturated fatty acids(%)	0	0	0	0	47.41

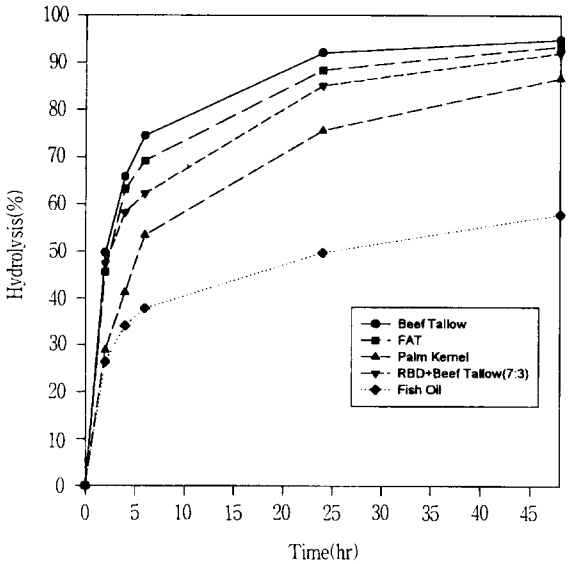

Figure 1. Hydrolysis patterns of Substrates by *Condida cylindracea* lipase.

는 Lipase-OF 360,000을 사용하였음에도 불구하고 가수분해율이 60%를 넘지 못하였다. 물고기기름의 가수분해반응에서 생성된 글리세라이드혼합물내의 지방산 변화를 나타내고 있는 Figure 2는 Lipase-OF 360,000이 n-3족 다중불포화지방산들에 대해 낮은 활성을 보이는 아실 체인 특이성을 가지고 있음을 보여준다. 실제로 Figure 3-a는 반응 전 물고기기름을 가스크로마토그래프를 통하여 구성 성분을 분석한 것이고, Figure 3-b는 Lipase-OF 360,000의 양을 0.4wt%로하여 물고기기름을 120시간동안 가수분해반응시킨 후 최종 생성혼합물의 구성 성분을 분석한 결과이다. 이 두 가지 결과를 비교하여 보면 가수분해반응 후 분해되지 않은 글리세라이드혼합물을 구성하고 있는 지방산의 조성은 n-3 다중불포화지방산을 제외하고는 그함량이 초기 물고기 함량에 비하여 크게 감소하였으나, DHA와 EPA의 함량은 증가하였다. 특히 DHA의 경우, 초기 물고기 기름을 구성하고 있는 절대량이 가수분해 후에도 글리세라이드 혼합물 내의 절대량과 거의 동일하여 Lipase-OF 360,000에 의하여 가수분해되지 않음을 알 수 있다. Gudmundur G. Haraldsson(2)은 리파제의 활성에 관한 연구에서, DHA의 경우에 낮은 리파제의 활성을 보이는 이유를 DHA내의 카르복실기의 가장 근접한 위치에 존재하는 이중결합이 리파제의 활성에 영향을 주는 것으로 보고한 바 있다. 이에 대해 본 연구결과에서는 Lipase-OF 360,000이

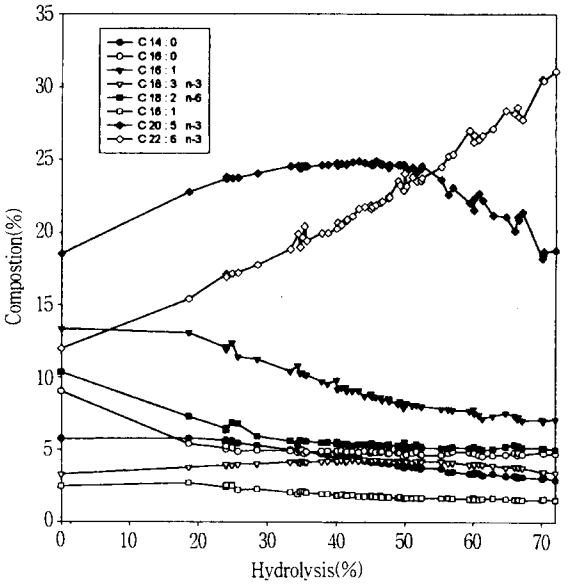

Figure 2. Change of fatty acids composition in the glyceride mixtures on hydrolysis of fish oil.

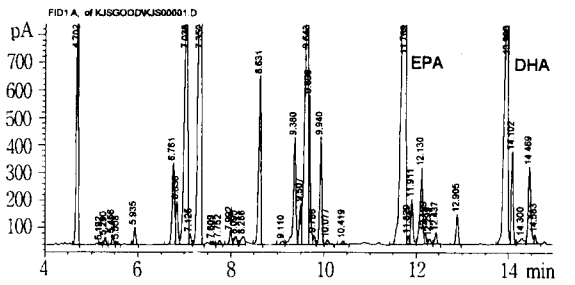

Figure 3-a. Analysis of fatty acids composition consisting in raw fish oil by GC system.

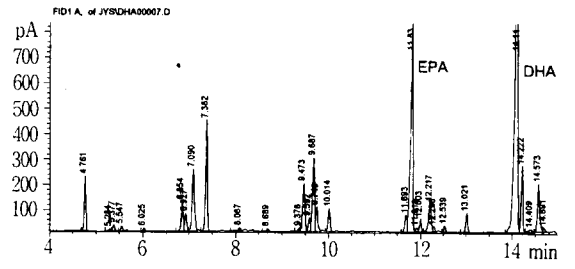

Figure 3-b. Analysis of fatty acids composition consisting in glyceride mixtures by GC system after hydroysis of fish oil by lipase-OF 0.4wt%.

내포하고 있는 아실 체인 특이성을 두가지로 요약하였다. 첫 번째는 Lipase-OF 360,000에 의한 물고기기름의 가수분해에 있어서 stearidonic acid, EPA, DHA와 같은 n-3족 다중불포화지방산들은 다른 포화지방산들에 비해 Lipase-OF 360,000의 좋은 기질로 작용하지 못하였다. 이는 Lipase-OF 360,000이 기질을 인식, 활성을 나타내는데 있어서 다중불포화지방산내에 특정 위치의 이중결합(n-3)이 Lipase-OF 360,000의 활성에 영향을 미

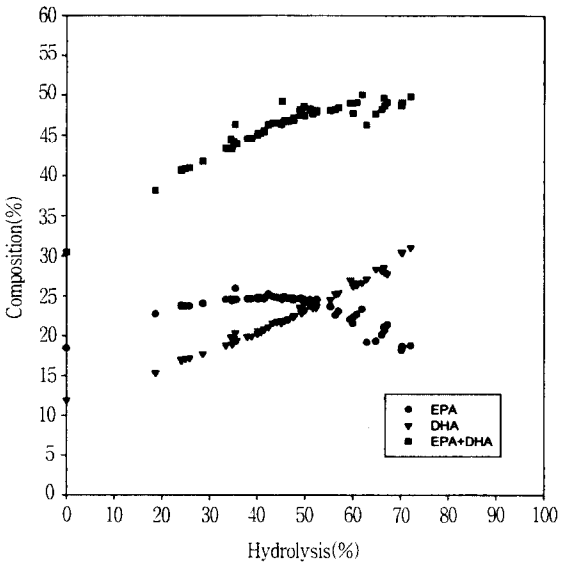

Figure 4. Relations between n-3 polyunsaturated fatty acids composition and hydroysis of fish oil.
EPA : eicosapentaenoic acid
DHA : docosahexaenoic acid

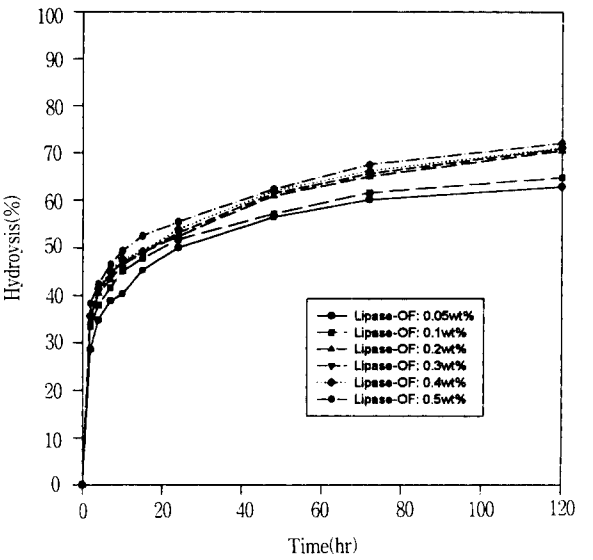

Figure 5. Effects of lipase concentration on the functional relationship between the hydroysis of fish oil and the reaction time.

치는 것으로 여겨진다. 두 번째로 물고기기름의 가수분해반응 초기에는 n-3족 다중불포화지방산들이 모두 증가하다가 점차 가수분해반응이 진행되면서 다중불포화지방산내의 탄소수와 불포화도가 가장 높은 DHA를 제외한 다른 n-3족 다중불포화지방산들도 가수분해반응이 서서히 진행되는 결과를 볼 수 있었다. 이 연구결과를 통해 특정 위치의 이중결합 뿐만 아니라, 다중불포화지방산내의 탄소수와 불포화도도 역시 가수분해반응에서 Lipase-OF 360,000의 활성에 영향을 미치는 것을 알 수 있다.

가수분해에 따른 EPA와 DHA의 변화량

물고기기름을 리파제로 가수분해시키면 가수분해가 전혀 일어나지 않은 트리글리세라이드, 부분적으로 가수분해가 진행된 1,3-디글리세라이드, 1,2-디글리세라이드 및 모노글리세라이드와 유리지방산, 글리세롤의 혼합물이 생성된다. Lipase-OF 360,000은 아실 체인 특이성을 내포하고 있기 때문에 가수분해가 진행되면 포화지방산은 유리지방산으로 분해되나 다중불포화지방산은 상당부분 가수분해되지 않고 트리글리세라이드, 디글리세라이드 및 모노글리세라이드의 구성성분으로 남아있게 된다. Figure 4는 Lipase-OF 360,000에 의한 물고기기름의 가수분해율과 글리세라이드 혼합물을 구성하고 있는 DHA와 EPA의 함량 사이의 함수관계를 나타내고 있다. 가수분해가 진행됨에 따라 글리세라이드 혼합물내의 DHA함량은 초기 11wt%에서 지속적으로 증가하여 가수분해가 더 이상 진행되지 않는 가수분해율 73%에서 최대 31wt%를 나타내었다. 이 최대값은 초기 물고기기름 내의 DHA 무게조성의 약 3배로 Lipase-OF 360,000의 가수분해에 의하여 물고기기름 내의 DHA의 함량을 최대 3배까지 농축시킬 수 있음을 알 수 있다. 글리세라이드혼합물내에 농축되는 EPA의 함량은 가수분해율에 따라 몇 가지 서로 다른 경향을 나타내었다. 가수분해율이 0내지 30%의 범위인 반응초기에는 가수분해가 진행됨에 따라 글리세라이드혼합물 내의 EPA함량은 초기값 18wt%에서 25wt%까지 서서히 증가하였으나 가수분해율이 30내지 50%사이에서는 일정한 값 25wt%를 유지하였다. 가수분해가 50%이상 진행되면 가수분해율 증가에 따라 글리세라이드 혼합물 내의 EPA의 함량은 감소하여 가수분해율이 52%에 이르면 글리세라이드혼합물내의 EPA의 함량과 DHA의 함량이 동일하게 되었다. 가수분해율 52% 이상일 때는 가수분해가 진행됨에 따라 글리세라이드혼합물내의 DHA증가량과 EPA의 감소량이 동일하여 글리세라이드내의 n-3족 불포화지방산의 함량은 49wt% 근방의 일정한 값을 유지하였다. 효소량이 가수분해속도와 아실 체인 특이성에 미치는 영향을 규명하여 보았다.

Figure 5에 나타난 바와 같이 효소의 양이 물고기기름의 0.05wt%, 0.1wt%, 0.2wt%, 0.3wt%, 0.4wt% 및 0.5wt%로 증가함에 따라 가수분해속도는 증가하였으며 120시간 가수분해 후에 생성된 혼합글리세라이드 내의 DHA의 조성도 Table 2에서와 같이 효소량이 증가함에 따라 증가하는 경향을 나타내었다. 효소량에 관계없이 가수분해율과 혼합글리세라이드내의 DHA와 EPA 조성사이의 함수관계가 Figure 4에 표시되어있다. 이 결과에 의하면 효소의 양에 관계없이 가수분해율이 동일하면 혼합글리세라이드를 구성하는 DHA와 EPA의 조성도 동일함을 알 수 있다. 실제로 물고기기름의 0.05wt%에 해당하는 Lipase-OF 360,000를 사용하여 약 24시간 가수분해시켜 가수분해율이 50%일 때 DHA와 EPA함량은 각각 23.2%, 24.2%이었고, 물고기기름의 0.5wt%인 Lipase-OF 360,000를 사용하여 약 10시간 가수분해시켜 가수분해율이 50%일 때의 DHA와 EPA함량은 각각 23.2%, 24.6%이었다. 이들 결과를 종합하면 효소량에 따라 가수분해율이 다른경우에는 생성된 글리세라이드 혼합물을 구성하는 DHA와 EPA의 조성도 서로 다르나 효소량에 관계없이 가수분해율이 동일한 경우에는 DHA와 EPA의 조성도 동일하다고 해석된다.

Table 2. Change of fatty acids in the glyceride mixtures on hydrolysis of fish oil.

Fatty Acids	Composition of Raw Fish Oil Before Reaction	Composition of Glyceride Mixtures After Hydroysis of Fish Oil for 120hr					
		0.05wt%	0.1wt%	0.2wt%	0.3wt%	0.4wt%	0.5wt%
C14 : 0	5.752%	3.334%	3.190%	3.342%	3.1724%	3.003%	2.8935%
C16 : 0	9.012%	5.060%	4.976%	4.958%	4.903%	4.848%	4.708%
C16 : 1	12.337%	7.583%	7.542%	7.902%	7.603%	7.305%	7.113%
C18 : 3 n-3	3.284%	3.924%	3.798%	3.822%	3.634%	3.446%	3.503%
C18 : 2 n-6	10.351%	5.663%	5.543%	5.621%	5.512%	5.404%	5.200%
C18 : 1	2.469%	1.688%	1.615%	1.754%	1.651%	1.547%	1.475%
C20 : 5 n-3	18.517%	19.202%	19.364%	19.393%	18.806%	18.220%	18.788%
C22 : 6 n-3	11.978%	27.143%	28.381%	30.436%	30.498%	30.540%	31.039%

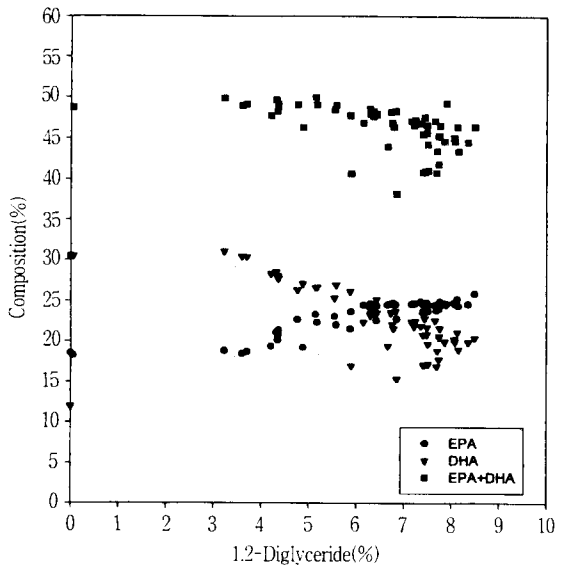

Figure 6. Relations between n-3 polyunsaturated fatty acids composition and 1,2-diglyceride composition in the glyceride mixtures.

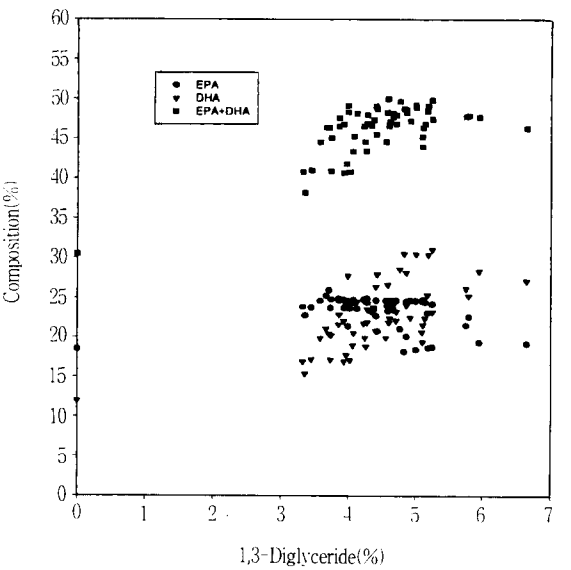

Figure 7. Relations between n-3 polyunsaturated fatty acids composition and 1,3-diglyceride composition in the glyceride mixtures.

글리세라이드혼합물내에서 디글리세라이드량과 EPA 및 DHA함량 사이의 관계

DHA는 1,2,3-트리글리세라이드의 두 번째 위치에 대부분 결합되어 있다고 보고되고 있으며 이런 위치특이성을 이용하여 DHA를 농축하려는 연구가 진행되고 있다(5). 그러나 1,2,3-트리글리세라이드의 1,3 위치에 대한 반응 위치 특이성의 리파제를 이용하여 DHA를 농축하려는 연구는 반응 도중 아실기의 전위(acyl migration)로 인하여 좋은 결과를 얻지 못하였다. 본 연구에서 사용한 Lipase-OF 360,000은 아실 체인 특이성은 나타내나 위치 특이성이 없는 리파제이다(6). 따라서 Lipase-OF 360,000에 의하여 가수분해가 진행되는 동안 포화지방산은 유리지방산으로 분해되나 n-3족의 불포화지방산은 글리세라이드의 구성성분으로 남아있게 된다. Figure 6과 Figure 7은 Lipase-OF 360,000에 의한 가수분해 과정에서 트리글리세라이드가 부분적으로 분해된 1,2-디글리세라이드와 1,3-디글리세라이드의 생성량과 DHA와 EPA함량 사이의 관계를 나타내고 있다. Figure 6의 결과에 의하면 글리세라이드혼합물 중 1,2-디글리세라이드의 함량이 증가할 경우 DHA의 양이 감소하는 반면 EPA의 양은 증가하였다. Figure 7의 결과에 의하면 1,3-디글리세라이드 양이 증가하면 DHA의 양은 전반적으로 증가하는 경향을 나타내었으나 EPA의 양은 뚜렷한 증가와 감소의 경향을 나타내지 않았다. 이와 같은 연구결과는 DHA가 트리글세라이드 중앙에 결합되어 있다는 연구결과(5)에는 상반되나 가수분해과정 중 아실기의 전위에 의한 DHA의 위치이동을 보고한 연구결과(4)에는 부합된다고 해석할 수 있다. 이러한 차이의 원인은 2-모노글리세라이드 농축에 관한 Holmberg와 Osterberg(7)의 연구에서 확인할 수 있다. 그들은 1,3-반응위치특이성을 가지는 리파제로 유지를 가수분해시켜 2-모노글리세라이드 농축을 시도하였다. 이들의 연구결과에 의하면 과다의 1,3-반응위치특이성 리파제로 짧은 반응시간 동안 가수분해시켰을 때 2-모노글리세라이드가 농축되

었으나, 가수분해반응 시간이 길어질 경우 아실기의 전위에 의하여 1 또는 3-모노글리세라이드의 양이 증가하였다. 따라서 본 연구의 결과도 반응이 진행됨에 따라 아실기가 글리세라이드의 2번째 위치에서 1번 또는 3번 위치로 전위가 된다고 해석할 수 있다.

요 약

*Candida cylindracea*유래의 리파제인 lipase-OF 360,000를 이용한 다중불포화지방산의 농축공정개발에 관한 연구를 수행하였다. Lipase-OF 360,000은 5가지 종류에 대한 유지의 가수분해에서 다중불포화지방산인 n-3족 아실기를 다량 함유하는 물고기기름에 대해서만 낮은 활성을 보였다. 이 리파제에 의한 물고기기름의 가수분해에서 반응이 진행됨에 따라 DHA는 계속 농축되는 양상을 보이지만 EPA의 경우는 가수분해반응이 0-30% 진행시까지는 완만하게 농축이 진행되다가 30-50% 진행되는 동안은 더 이상의 농축이 진행되지 않았고 약 50% 이상부터는 감소하기 시작하여 반응 완료시에는 반응전 물고기기름에 있어서 EPA의 함량과 거의 비슷한 약 18% 정도로 감소되었다. 이러한 양상은 기질에 대한 Lipase-OF 360,000의 농도에 상관없이 거의 유사하게 일어났다. 본 연구결과로서 Lipase-OF 360,000의 아실 체인 특이성을 두 가지로 요약할 수 있는데 첫 번째는 가수분해에 있어서 물고기기름내의 n-3족 다중불포화지방산과 그 외의 다른 지방산들의 차별성이다. Lipase-OF 360,000은 n-3족 다중불포화지방산에 대해서만 현저히 낮은 활성을 보였다. 두 번째는 n-3족 다중불포화지방산이 가지는 구조적 차이가 Lipase-OF 360,000의 특이적 활성에 미치는 영향이다. 이 경우는 n-3족 다중불포화지방산내의 탄소수와 불포화도가 높을수록 Lipase-OF 360,000의 활성이 좋지 않았다.

감 사

본 연구는 1996년도 교육부의 생물화공 연구비 지원과 인하대학교 대학원생 연구장학금 지원에 의하여 수행되었습니다. 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Tanaka, Y., J. Hirano, and T. Funada (1992), Concentration of Docosahexaenic acid in Glyceride by Hydrolysis of Fish Oil with *Candida cylindracea* Lipase, *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **69**, 1210-1214
2. Haraldsson, G. G., B. Ö. Gudmundsson, and Ö. Almarsson (1993), The Preparation of Homogeneous Triglycerides of Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid By Lipase, *Tetrahedron Lett.*, **34(36)**, 5791-5794.
3. Kosugi, Y., and N. Azuma (1994), Synthesis of Triacylglycerol from Polyunsaturated Fatty Acid by Immobilized Lipase, *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **71(12)**, 1397-1403.
4. Boswinkel, G., J. T. P. Derksen, K. van't Riet, and F. P. Cuperusa (1996), Kinetics of Acyl Migration in Monoglycerides and Dependence on Acyl Chain Length, *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **73(6)**, 707-711.
5. Yadwad, V. B., O. P. Ward, and L. C. Noronha (1991), Application of Lipase to Concentrate the Docosahexaenoic Acid (DHA) Fraction of Fish Oil, *Biotechnol. Bioeng.*, **38**, 956-959.
6. Jung, J. Y. (1996), "Lipid Hydrolysis by Lipase Immobilized on Hydrophobic Support", M.S. Thesis, Dept. of Biological Engineering, Inha Univ. Inchon.
7. Holmberg, K., and E. Osterberg (1988), Enzymatic Preparation of 0Monoglycerides in Microemulsions, *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **65**, 1544-1548.
8. Li, Z. Y., and O. P. Ward (1993), Enzyme Catalysed Production of Vegetable Oils Containing Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acid, *Biotechnol. Lett.*, **15**, 185-188.
9. Mukherjee, K. D., I. Kiewitt, and M. J. Hills (1993), Substrate Specificities of Lipases in View of Kinetic Resolution of Unsaturated Fatty Acids, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **40**, 489-493.
10. Shimada, Y., K. Maruyama, S. Okazaki, M. Nakamura, A. Sugihara, and Y. Tomina (1994), Enrichment of Polyunsaturated Fatty Acids with *Geotrichum candidum* Lipase, *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **71(9)**, 951-954.
11. 한국공업규격 시료유지의 탈산방법 KSM 2731, 1985.
12. Lepage, G., and C. C. Roy (1984), Improved Recovery of Fatty Acid Through Direct Transesterification without Prior Extraction or Purification, *J. Lipid Res.*, **25**, 1391-1396.