

## 아실체인 구조가 효소 Lipase-OF 360,000에 의한 지방산의 가수분해 특성에 미치는 영향

†허 병 기·우 동 진·박 경 원  
인하대학교 공과대학 화공·고분자·생물공학부  
(접수 : 2000. 1. 20., 개재승인 : 2000. 2. 15.)

## The Effect of Acyl Chain Structure on the Hydrolysis of Fatty Acids from Fish Oil by Lipase-OF 360,000

Byung-Ki Huh<sup>†</sup>, Dong-Jin Woo, and Kyung-Won Park  
School of Chemical, Polymer, and Biological Engineering, Inha University, Inchon 402-751, Korea  
(Received : 2000. 1. 20., Accepted : 2000. 2. 15.)

The hydrolysis characteristics of each fatty acid composing the fish oil by means of the lipase from *Candida cylindracea* was investigated. The saturated fatty acids, C14:0, C16:0 and C18:0, and the unsaturated fatty acids with one double bond, C16:1, C18:1(n-7), C18:1(n-9), C20:1 and C22:1 were more easily hydrolyzed than the  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids. When the number of carbon of the  $\omega$ -3 fatty acids was same but that of double bond was different, the hydrolysis of the  $\omega$ -3 fatty acids having lower number of double bond was more rapidly carried out. When the degree of polyunsaturation was same but the number of carbon was different, the lipase acted more rapidly upon the  $\omega$ -3 fatty acids with lower number of carbon. Docosahexaenoic acid(DHA) was most highly concentrated in the glyceride mixture after 120hr hydrolysis among the various  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids. The weight percentage of DHA to the  $\omega$ -3 fatty acids in the fish oil was 31.87% but that in the glyceride mixture after 120hr hydrolysis was 51.89%

**Key words :** hydrolysis, saturated fatty acid, polyunsaturated fatty acid, docosahexaenoic acid

### 서 론

지질은 여러 종류의 지방산과 글리세롤이 응축반응에 의하여 에스테르화되어 생성된 생체화합물이다. 생명체의 종류에 따라서 지질을 구성하는 지방산의 종류와 조성이 고유하다. 생명체는 합성된 지질을 생명현상유지에 필요한 지방산과 글리세롤로 분해시키기 위하여 가수분해효소를 생산한다. 현재 까지 알려져 있는 지질의 가수분해효소 리파제는 기질과의 반응특성에 따라서 위치특이성(positional specificity)리파제, 아실체인 특이성(acyl chain specificity)리파제, 부분글리세롤 분해 특이성 리파제, 인지질 및 지단백질 분해 특이성 리파제로 구분된다(1,2).

Lipase-OF 360,000은 아실체인 특이성을 나타내는 리파제로 지질을 구성하는 지방산의 탄소수 및 이중결합수에 따라서 반응속도를 달리하는 특성을 지니고 있다(3). 특히 물고기

기름에 다량 함유되어 있는 eicosapentaenoic acid(EPA)와 docosahexaenoic acid(DHA)에 반응특이성을 나타낸다고 보고되어 있다(4). Yuji Shimada(6), Yukihisa Tanaka(1)와 허(9)등은 아실기의 탄소수와 이중결합수에 특이성을 나타내는 리파제를 이용하여 글리세라이드 혼합물내에 DHA의 함량을 20내지 30%까지 농축하기도 하였다.

물고기 기름에 다량 함유되어 있는  $\omega$ -3 다중불포화지방산 중 EPA와 DHA는 임상학적 효과 때문에 많은 연구자들의 연구대상이 되어왔다. 특히 DHA는 망막과 뇌를 구성하고 있는 인지질의 주요 성분으로 중추신경계의 필수물질로 알려져 있다. 인간은 체내에서 자체적으로 DHA를 합성할 수 없기 때문에 천연물 특히 해산물로부터 DHA를 섭취한다. 해산물 중 물고기 기름은 DHA를 10내지 20%를 포함하고 있으므로 DHA 섭취의 가장 주요한 재원이 되고 있다(1). 사슬이 긴  $\omega$ -3 다중 불포화 지방산은 불안정하여 열이나 공기에 의하여 쉽게 산화되며 시스-트랜스 이성화 반응 및 이중결합의 전이 반응에 의하여 다중불포화지방산의  $\omega$ -3 구조가 쉽게 파괴되는 단점이 있다(2). 따라서 물고기 기름으로부터  $\omega$ -3 다중불포화지방산을 분리 농축하는 공정은 상온 및 상압의 조건하에서 이루어져야 한다. 이런 제약조건에 가장 적합한

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

공정중의 하나가 생체촉매인 효소를 이용하는 공정이다(3). 본 연구에서는 아실체인 특이성을 나타내는 *Candida cylindracea* 유래의 Lipase-OF 360,000이 물고기 기름을 구성하는 여러 종류의  $\omega$ -3 다중불포화지방산의 가수분해 특성에 미치는 영향을 규명하고 그 결과를 Lipase-OF 360,000을 이용한 DHA농축공정개발에 대한 기초자료로 이용하고자 하였다.

## 재료 및 방법

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

효소 : 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, 최적 pH는 5내지 7, 최적 반응온도는 30내지 40°C로 알려져 있다(10).

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

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

에스테르화 반응 : Guy Lepage의 방법(8)을 변형시켜 사용하였다. 탈산공정을 거친 시료 400mg에 아세틸클로라이드-메탄을 용액 3mL을 참가한 후 질소하에서 100°C로 1시간 중탕가열하여 에스테르화반응을 시켰다. 중탕 가열 후 상온에서 냉각하고 핵산 6mL을 참가하여 60초동안 교반하였다. 여기에 중류수 3mL을 첨가하고 30초동안 교반하면 용액은 두상으로 분리된다. 아래 상은 아세틸클로라이드와 물 및 수용성 물질의 혼합상이고 윗 상은 메틸에스터 지방산이 용해되어 있는 핵산용액이다. 이 핵산용액을 분리하여 가스크로마토그래

프의 분석시료로 사용하였다.

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

TLC-FID 분석 : 반응 시간 별로 채취한 시료를 100°C 끓는 물에서 효소의 반응을 정지시킨 후 3600rpm에서 15분간 원심분리하고, 기름층에서 100 μL를 점적하여 100mm의 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. 결과 처리는 일본 IATRON社의 IATROCORDER TC-21을 사용하였다.

## 결과 및 고찰

### 반응시간에 대한 아실체인의 가수분해 특성

가수분해반응시간에 따라서 가수분해되지 않고 글리세라이드 혼합물내의 구성성분으로 남아있는 지방산이 아실체인의 특성과 어떤 함수관계를 나타내는지 분석하여 보았다.

Figure 1의 결과에 의하면 C<sub>14:0</sub>, C<sub>16:0</sub> 및 C<sub>18:0</sub>인 포화지방산은 불포화 아실체인에 비하여 Lipase-OF 360,000에 의하여 쉽게 가수분해되는 경향을 보이고 있다. 물고기기름을 구성하고 있는 포화지방산의 무게조성이 22.4%이었으나 가수분해시간에 따라서 모노-, 디-, 및 트리-글리세라이드 혼합물 속에 남아있는 포화지방산의 무게조성은 점차 감소하여 가수분해 10시간후에는 15%까지 감소하였다. 이중결합이 하나인 C<sub>16:1</sub>, C<sub>18:1(n-7)</sub>, C<sub>18:1(n-9)</sub> C<sub>20:1</sub> 및 C<sub>22:1</sub>의 불포화지방산의 가수분해특성도 포화지방산의 가수분해 특성과 유사한 경향을 나타내었다.

물고기기름의 트리-글리세라이드에 대한 불포화도가 1인 지방산의 무게조성은 29.1%이었으나 반응 10시간후 글리세라이드 혼합물내의 무게조성은 17.6%까지 감소하였다. 반면  $\omega$ -3 다중불포화지방은 포화지방산 및 불포화도가 1인 지방

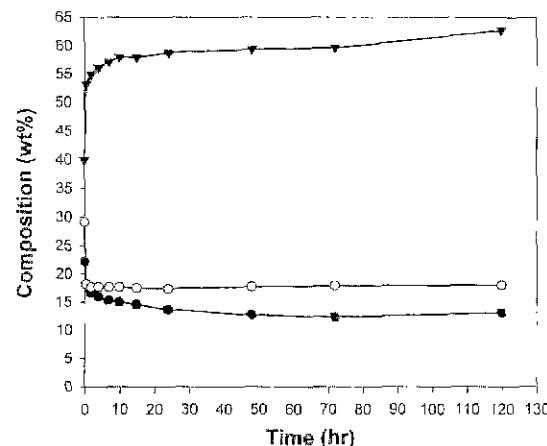
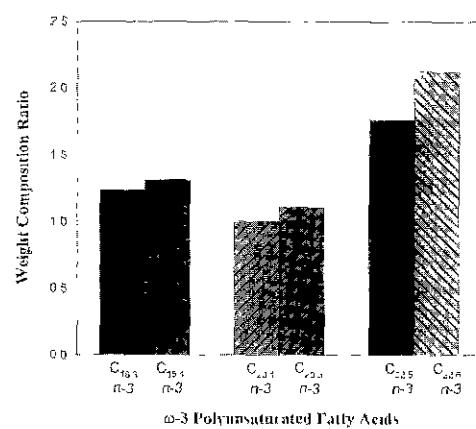


Figure 1. The hydrolysis of the fatty acids composing the fish oil by Lipase-OF 360,000. ● : saturated fatty acids, ○ : unsaturated fatty acid with single double bond, ▼ :  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids

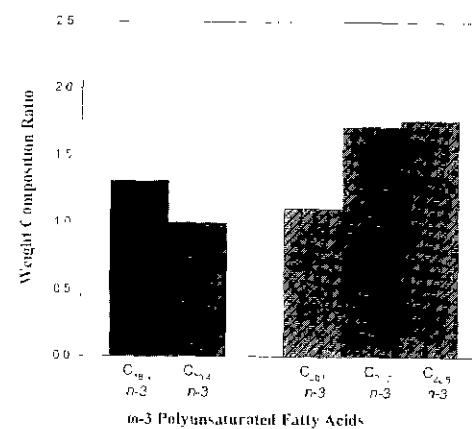


**Figure 2.** The effect of degree of unsaturation on the weight compositions ratio of  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids between the fish oil and the glyceride mixture after 48h hydrolysis.

산과는 삼이한 가수분해특성을 나타내었다. 물고기기름을 구성하고 있는  $\omega$ -3 다중 불포화 지방산의 총무게 조성은 31.87%이였으나 가수분해반응시간에 따라 생성되는 글리세라이드 혼합물의 총무게 조성은 점차 증가하여 반응시간 10시간 후에는 60%를 나타내었다. 이 결과는  $\omega$ -3 다중불포화지방산이 Lipase-OF 360,000에 의하여 유리지방산으로 가수분해되며 글리세라이드 혼합물내의 구성 성분으로 남아 있는 경향이 크다는 것을 나타내고 있다. Yadwad 등(5)은 Lipase-N을 사용하여 물고기의 간유로부터 DHA를 농축하는 실험을 수행하여 본 연구와 유사한 결과를 얻었다. 간유내의 DHA조성은 9.68%에 불과하였으나 72시간동안 가수분해시킨 후에는 모노글리세라이드내에 최대 29.17%까지 DHA를 농축시킬수 있었다. 이 결과 역시 리파제에 의하여 DHA를 글리세라이드 혼합물 내로 농축시킬 수 있는 가능성을 제시하고 있다. 이외에 Tanaka 등(1)도 *Candida cylindracea* 유래의 효소를 이용하여 물고기 기름으로부터 DHA를 3배 이상 농축시킨 연구 결과를 발표하였다.

#### $\omega$ -3 다중불포화지방산의 불포화도가 Lipase-OF 360,000의 유지 가수분해특성에 미치는 영향

$\omega$ -3 다중불포화 지방산의 불포화도가 Lipase-OF 360,000의 가수분해특성에 미치는 영향을 규명하기 위하여 탄소수는 동일하나 불포화도가 서로 다른 지방산의 가수분해특성을 분석하여 보았다. 물고기기름을 Lipase-OF 360,000으로 48시간 가수분해시킨후 가수분해되지 않고 남아 있는 글리세라이드 내의 지방산 무게조성과 물고기기름을 구성하는 동일지방산의 무게조성의 비를 탄소수가 18개, 20개 및 22개인 다중불포화지방산에 대하여 분석한 후 그 결과를 Fig.2에 도시하였다. 이 결과에 의하면 탄소수에 관계없이 불포화도가 큰 지방산의 가수분해율이 불포화도가 낮은 지방산의 가수분해율보다 적어서 모노-, 디- 및 트리-글리세라이드 혼합물내로 농축되는 경향을 나타내었다. Shirnada 등(7)은 *Candida cylindracea*, *Geotrichum candidum*, *Rhizopus delemar* 및 *Fusarium heterosporum*의 균주로부터 추출해낸 리파제를 이용하여 Tuna oil의 가수분해 특성을 규명하였다. 이들의 결과에 의하면 네 종류의 리파제 모두 불포화도가 높은 C<sub>22,6</sub>(n-3)



**Figure 3** The effect of number of carbon of fatty acids on the weight composition ratio of the weight composition of PUFAs in the glyceride mixture to that in the fish oil

보다 불포화가 낮은 지방산을 쉽게 가수분해시키는 경향을 나타내었다. 이들 연구결과는 동일한 탄소수에 대한 결과는 아니나 불포화도가 리파제의 가수분해 특성에 영향을 미치고 있다는 결과로 본 연구의 결과와 그 경향이 일치하고 있다고 해석할 수 있다.

$\omega$ -3 다중불포화지방산의 탄소수가 Lipase-OF 360,000의 가수분해 특성에 미치는 영향을 분석하여 보았다. Fig.3은 불포화도가 4인 C<sub>18,4</sub>와 C<sub>20,4</sub>, 불포화도가 5인 C<sub>20,5</sub>, C<sub>21,5</sub> 및 C<sub>22,6</sub>에서 탄소수에 따른 가수분해특성을 나타내고 있다. 이 결과는 글리세라이드 혼합물내의 지방산무게조성과 초기 물고기기름을 구성하고 있던 동일지방산의 무게조성의 비를 나타낸 결과이다. 불포화도가 4인 경우 탄소수가 많은 C<sub>20,4</sub>가 C<sub>18,4</sub>보다 가수분해가 더 용이하게 이루어짐을 알 수 있다. 반면 불포화도가 5인 경우 지방산 내의 탄소수가 증가하면 반응 후 남아 있는 글리세라이드 혼합물 내의 불포화지방산의 무게조성도 증가하였다. 현재까지 동일한 불포화도에서 탄소수 증가에 따른 가수분해 영향을 해석한 연구결과가 이루어지지 않아 본 연구결과와 비교검토 할 수 없었다.

#### 가수분해시간에 따른 $\omega$ -3다중불포화지방산의 조성변화

물고기 기름을 구성하고 있는  $\omega$ -3 다중불포화지방산의 각 성분 조성이 가수분해시간에 따라서 어떤 변화경향을 나타내는지를 분석하여 보았다. 물고기 기름을 구성하고 있는  $\omega$ -3 다중불포화지방산의 무게조성은 31.87%이였으나 가수분해시간에 따른 글리세라이드 혼합물내의  $\omega$ -3다중불포화지방산의 무게조성은 점차 증가하여 가수분해 72시간 후에는 60% 까지 상승하였다.  $\omega$ -3 다중불포화지방산을 구성하는 성분별 가수분해특성을 살펴보면 두가지 특성으로 분류할 수 있다. C<sub>18,4</sub>, C<sub>20,4</sub> 및 C<sub>20,5</sub>의  $\omega$ -3 지방산은 가수분해시간에 따라서 글리세라이드 혼합물내의 무게조성이 증가하였다가 감소하였다. 반면 C<sub>18,3</sub>, C<sub>21,5</sub> 및 C<sub>22,6</sub>은 가수분해시간에 따라 무게조성이 계속 증가하였다. 이 결과에 의하면 탄소수가 많고 불포화도가 높은  $\omega$ -3 다중불포화지방산일수록 가수분해되지 않고 글리세라이드 혼합물 내로 농축되는 경향을 나타내었다. 이와 같은 경향은 여러 연구들(1,5,7)에 의하여 확인된 바 있으나 성분별 정확한 분석은 이루어지지 아니하였다. Fig.4는

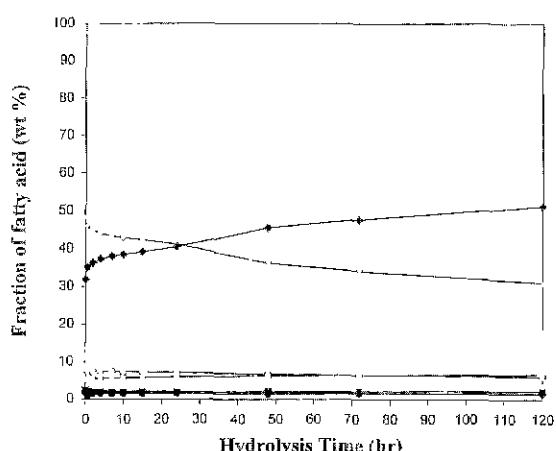


Figure 4. The variation of composition of the  $\omega$ -3 fatty acid with the hydrolysis time. ◆ : C<sub>22:6</sub> n-3, □ : C<sub>22:5</sub> n-3, ■ : C<sub>21:5</sub> n-3, ▽ : C<sub>20:5</sub> n-3, ▼ : C<sub>20:4</sub> n-3, ○ : C<sub>18:3</sub> n-3.

가수분해에 따라 생성되는 글리세라이드 혼합물 중  $\omega$ -3다중불포화 지방산의 총량을 100으로 하였을 경우  $\omega$ -3지방산의 각 성분별 조성이 가수분해 시간에 따라서 어떤 변화 경향을 나타내는지를 보여주고 있다. 이 결과에 의하면  $\omega$ -3다중불포화지방산 중에서 무게조성이 가수분해 시간에 따라서 증가하는 성분은 C<sub>21:5</sub>, C<sub>22:5</sub>와 C<sub>22:6</sub>의 세 성분뿐이며 나머지 성분들은 모두 감소 경향을 나타내었다. 감소폭이 가장 큰 성분은 EPA로 초기 물고기 기름 중  $\omega$ -3 총지방산의 48.37%였으나 120시간 가수분해 후에는 30.92%로 감소하였다. 반면 DHA는 초기 31.87%에서 51.89%까지 증가하였다.

## 요 약

*Candida cylindracea* 유래의 효소 Lipase-OF 360,000을 사용하여 물고기 기름을 구성하고 있는 각 지방산의 가수분해 특성을 규명하여 보았다. 물고기 기름을 구성하고 있는 다양한 지방산 중 C<sub>14:0</sub>, C<sub>16:0</sub> 및 C<sub>18:0</sub>의 포화지방산과 이중결합이 하나인 C<sub>16:1</sub>, C<sub>18:1</sub>(n-7), C<sub>18:1</sub>(n-9), C<sub>20:1</sub> 및 C<sub>22:1</sub>의 불포화 지방산은  $\omega$ -3 다중불포화지방산에 비하여 쉽게 가수분해되었다.  $\omega$ -3다중불포화지방산 중 탄소수는 동일하나 불포화도가 상이할 경우 불포화도가 낮은 지방산이 불포화도가 높은 지방산보다 쉽게 가수분해되는 특성을 나타내었으며, 불포화도는 동일하나 탄소수가 다른 경우 탄소수가 적은 지방산이 탄소수가 많은 지방산보다 쉽게 가수분해되었다.  $\omega$ -3 다중불포화지방산 중 가수분해 반응 후 모노-, 디- 및 트리-글리세라이드 혼합물에 가장 많이 농축되는 지방산은 DHA로 물고기

기름을 구성하는 총  $\omega$ -3 지방산의 31.87%에서 가수분해반응 120시간 후에는 글리세라이드 혼합물을 구성하는 총  $\omega$ -3 지방산의 51.89%까지 증가하였다.

## 감 사

본 연구는 1999년도 인하대학교 교내 연구비 지원에 의해 수행된 결과입니다. 이에 대하여 감사드립니다.

## REFERENCES

- Tanaka, Y., J. Hirano, and T. Funada (1992), Concentration of Docosahexaenoic acid in Glyceride by Hydrolysis of Fish Oil with *Candida cylindracea* Lipase, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **69**, 1210-1214.
- Haraldsson, G. G., B. Ö. Gudmundsson, and O. Almarsson (1993), The Preparation of Homogeneous Triglycerides of Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid By Lipase, *Tetrahedron Lett.* **34**(36), 5791-5794.
- 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.
- Boswinkel, G., J. T. P. Derkens, K. van't Riet, and F. P. Cuperus (1996), Kinetics of Acyl Migration in Monoglycerides and Dependence on Acyl Chain Length, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **73**(6), 707-711.
- 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.
- Holmberg, K. and E. Osterberg (1988), Enzymatic Preparation of Monoglycerides in Microemulsions, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **65**, 1544-1548.
- 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.
- 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.
- Jin, Y. S and B. K. Hur (1998), Process Development of Concentration of n-3 PUFA from Fish Oil by means of Lipase, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **13**(1), 90-95.
- Park, K. K., E. K. Kim and B. K. Hur (1999), The Effect of Environmental Factors on the Hydrolysis Characteristics of Lipase, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **14**(4), 511-516.