

유지방구로부터 분리한 Lipase의 활성에 미치는 pH의 영향

김 거 유

강원대학교 동물자원과학대학 축산가공학과

Effects of pH on the Activity of Lipase Isolated from Milk Fat Globules

G. Y. Kim

Dept. of Animal Food Science and Technology, Kangwon National University

Abstract

Effects of pH on the activity of lipase isolated from milk fat globules were investigated, using coconut oil and homogenized milk as substrate. With buttermilk as an enzyme source for coconut oil and homogenized milk substrates bell-shaped curve was observed at 37°C, having the highest activity at pH 9.5. However, lipase activity at 0°C continuously increased up to pH 10.0. With the purified lipase for homogenized milk substrate, the bell-shaped curve and the highest activity were observed at 37°C and pH 9.0, respectively. Lipase activity at 0°C increased up to pH 10.0. The addition of bovine serum albumin to the coconut oil shifted the optimum pH to pH 9.5 and the activity remarkably declined at pH 10.0. The effect of pH on the stability of purified lipase was depending on the temperature. When the lipase kept at 37°C for 20 minutes, it's activity remarkably declined as pH increased: the activity at pH 10.0 was declined by 13% of that pH 8.5. However, when the lipase kept at 4°C for 60minutes, the activity was stable within the range of pH 7.5 to 10.0.

Key words : lipase, activity, milk fat globules, pH.

서 론

원유 중의 유지방이 지방분해 효소에 의하여 분해될 경우 유리지방산이 생성되며, 생성된 유리지방산이 고농도로 함유되어 있을 경우 rancid flavor라고 하는 불쾌취를 내게 된다. 원유의 저온 저장 중 발생하는 자연발생적 지방분해에는 여러 가지 요인이 영향을 미치는데 무엇보다도 lipase의 영향이 크다고 할 수 있다. 신선한 원유 중에는 지방분해를 일으키기에 충분한 양의 lipase와 유지방이 함유되어 있다. 그러나 원유의 지방분해와 lipase의 활성사이에는 상관관계가 낮다. 그 이유는 여러 가지 다양한 생화학적 인자가 lipase의 활성에 영향을 미치기 때문이다⁽¹⁾. Lipase활성에 미치는 pH의

영향은 기원이 다른 lipase활성을 특징 지우기 위해⁽²⁾, 또는 활성부위의 메카니즘의 고찰⁽³⁾ 및 추정되는 활성부위의 이온정수를 구하기 위해서 중요하다⁽⁴⁾.

Lipase활성과 pH와의 관계에 대해서는 pH 8과 pH 9 사이에 최적 활성을 나타내는 종 형태의 곡선을 보고하였다^(5,6). 한편 기질에 따라 최적 pH를 나타내지 않고 lipase활성이 pH의 증가와 함께 활성도 연속적으로 증가한다고 하는 보고도 있다^(7,8). 또한 lipase의 활성은 온도에 따라 차이가 있다. 若浜와 齋藤⁽⁹⁾는 lipase의 활성이 반응온도 37°C와 0°C에서 기질에 따라 차이가 있었으며, 고온보다 저온에서 높은 pH에서도 안정하다고 하였다. 이와 같이 lipase활성과 pH와의 관계는 연구자들에 따라 상이한 결과를 나타내고 있다.

원유의 저온저장 중 발생하는 자연발생적 지방분해는 우유중의 lipase에 의하여 일어나며, lipase의 활성은 pH에 의하여 많은 영향을

Corresponding author : G. Y. Kim, Department of Animal Food Science and Technology, Kangwon National University.

받는다고 할 수 있다. 그러나 lipase의 활성에 미치는 pH의 영향에 관한 연구는 대부분 lipase의 최적조건에서 이루어진 결과들이다. 따라서 원유의 저장 중 발생하는 자연발생적 지방분해의 메카니즘을 밝히기 위해서는 최적조건에서의 lipase특성과 함께 저온에서의 특성에 관한 연구가 함께 이루어져야 한다.

본 연구는 원유의 저온저장중 발생하는 자연발생적 지방분해에 관련이 있는 유지방구 유래 lipase의 활성과 안정성에 미치는 pH의 영향에 대하여 검토하였다.

재료 및 방법

효소액의 조제

효소액은 정제 lipase와 조효소를 사용하였다. 정제 lipase는 金⁽¹⁰⁾의 방법에 따라 크립에 대하여 순도 3,126배로 분리 정제된 효소를 사용하였으며, 조효소는 lipase 정제에 사용한 버터밀크를 증류수에 투석한 다음 사용하였다.

기질 용액의 조제

기질은 야자유와 시판의 균질화유(시유: 유지방 3.6%)를 사용하였다. 야자유를 기질로 사용할 경우, 유화 안정제로 arabic gum(Wako社)을 사용하여 金 등⁽¹¹⁾의 방법에 따라 유화하였다. Tris-maleate acid 완충액(0.3M, pH 6.0~7.0), Tris-HCl 완충액(0.3M, pH 7.5~8.5), 그리고 glycine-NaOH 완충액(0.3M, pH 9.0~10.0)을 사용하여 기질 유화액과 동량 혼합한 것을 기질로 사용하였다. 시판의 균질화유를 사용할 경우에는 1N HCl 또는 1N NaOH를 사용하여 pH를 조정하였다. 야자유를 기질로 사용할 경우는 지방산 수용체로서 bovine serum albumin (BSA)을 각 완충액에 용해(1% w/v)하여 제조하였다.

Lipase 활성의 측정

효소활성은 기질용액 1.5ml를 시험관에 취하여 각 반응온도에서 예비 가온한 다음 효소액 0.8ml를 첨가하여 37°C에서 20분, 0°C에서 60분간 반응시켰다. 그 다음 추출용매(isopropyl alcohol : heptane : 1N H₂SO₄ = 25 : 25 : 2) 7.5ml를 첨가하여 2분간 교반하였다. 2시간 이상 정치 후 상정액 중의 유리지방산 함량은

phenol-red 법⁽¹²⁾에 의하여 측정하였다. 유리지방산 함량은 palmitic acid를 표준용액으로 측정하여 시료 1ml에 함유되어 있는 palmitic acid의 양으로 환산하여 mM로 나타내었다.

Lipase의 안정성에 미치는 pH의 영향

기질의 조제에 사용한 pH 6.0~10.0의 각 완충액을 각각 0.05M로 희석한 후 정제 lipase(0.006 mg/ml)를 첨가하여 37°C에서 20분, 4°C에서 60분간 정치한 후 lipase활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

Lipase의 활성에 미치는 pH의 영향

조효소(버터밀크)를 사용하였을 때 lipase활성에 미치는 pH의 영향을 유지방(Fig. 1)과 야자유(Fig. 2)를 기질로 하여 조사하였다. 반응온도 37°C에서는 두 가지 기질 모두에서 pH 9.5에 최대 활성을 나타내는 pH 의존곡선을 나타내었다. 그러나, 반응온도 0°C의 경우는 pH 10.0까지 pH의 증가와 함께 활성도 증가하였다. 효소 반응은 한정된 pH 범위에서 일어나며, 그 한정된 pH에서 효소 활성은 최대치를 나타내고, 그 pH 범위를 최적 pH라 한다. 일반적으로 최적 pH는 기원이 다른 효소의 특징을 구별

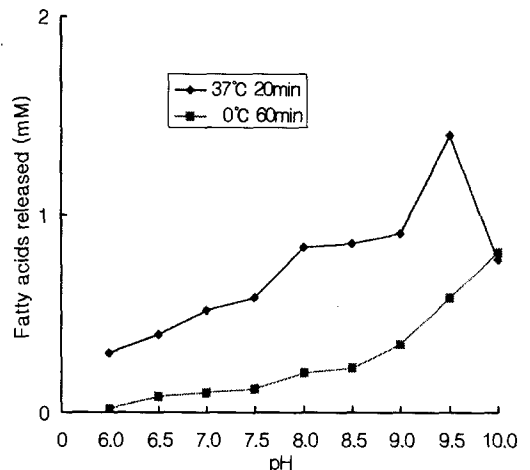


Fig. 1. Effects of pH on the activity of lipase of buttermilk for homogenized milk. The buffers used were Tris-maleate for pH 6~7, Tris-HCl for pH 7.5~8.5 and glycine-NaOH for pH 9~10.

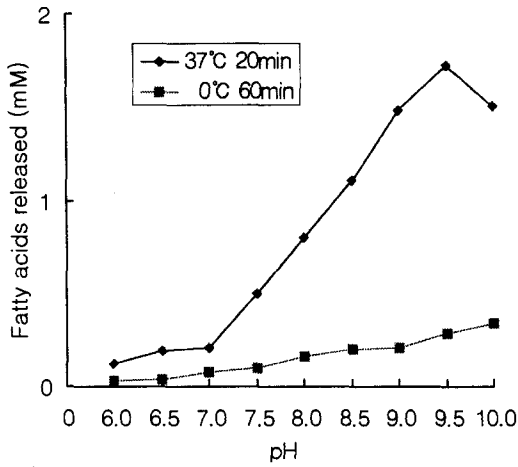


Fig. 2. Effects of pH on the activity of lipase of buttermilk for coconut oil. The buffers used were Tris-maleate for pH 6~7, Tris-HCl for pH 7.5~8.5 and glycine-NaOH for pH 9~10.

하는 하나의 기준이 된다. 그러나, 최적 pH는 사용하는 완충액의 종류, 이온강도와 사용한 효소원에 의하여 차이가 있다. 또한 lipase와 같이 물에 녹지 않는 기질에 작용하는 경우는 기질의 종류 및 기질 분자의 반응계에 있어서의 유화상태가 문제가 된다.

기질의 존재상태를 지배하는 인자에는 유화제 첨가 유무 및 유화제의 종류는 물론 반응온도, 반응 pH, 반응의 진행과 함께 축적되는 생성물의 조성비 등이 있다. Lipase가 유지방을 분해하게 되면 유리지방산이 생성되며, 이러한 유리지방산은 지방과 수층과의 계면에 축적되어 lipase의 활성을 억제한다⁽¹³⁾. 따라서 BSA와 같은 지방산 수용체가 효소작용을 위하여 필요하게 된다⁽¹⁴⁾.

조효소를 사용하였을 경우(Fig. 1과 Fig. 2), 반응온도 37°C에서는 pH 9.0부터 pH 9.5 사이에 최적 pH를 나타내었으나, 반응온도 0°C에서는 lipase 활성이 pH 10.0까지 pH와 함께 증가하였다. 이러한 결과는 반응온도 0°C가 37°C보다 lipase가 안정한 것이 하나의 원인으로 생각할 수 있다. 또한 효소원으로 사용한 버터밀크에는 효소 단백질 이외에도 유지방구막 유래 단백질성분과 그 외 여러 성분들이 함유되어 있다. 유지방구막 유래의 proteose-peptone component 3은 lipase의 활성을 억제하며⁽¹⁵⁾, co-

mponent-5는 lipase의 활성을 증가시키는 것으로 알려져 있다⁽¹⁶⁾. 또한 우유 단백질 성분이 lipase의 활성에 미치는 영향은 반응온도 등 측정조건에 따라 결과에 차이가 있다⁽¹⁷⁾. 따라서 버터밀크를 효소원으로 사용하였을 때 반응온도에 따라 pH의 영향에 대한 결과가 상이한 것은 버터밀크에 함유되어 있는 효소이외의 성분들이 영향을 미쳤을 것으로 생각된다.

정제효소의 활성에 미치는 pH의 영향

정제 lipase를 효소원으로 사용하였을 때, 활성에 미치는 pH의 영향을 Fig. 3과 Fig. 4에 나타내었다. 야자유를 기질로 사용하였을 경우는 야자유에 0.1%의 BSA를 첨가한 것을 기질로 하였다.

반응온도 37°C에서 유지방을 기질로 사용하였을 경우 lipase 활성은 pH 9.0에 최대 활성을 나타내는 전형적인 종형의 pH 의존곡선을 나타내었다. 또한 반응온도 0°C에서는 pH 10.0까지 pH의 증가와 함께 활성도 증가하였다(Fig. 3). 야자유를 기질로 사용하였을 경우는 (Fig. 4), 반응온도 37°C, 0°C 모두 pH 9.5에서 최대 활성을 나타내었으며, pH 10.0에서 현저하게 활성이 저하하였다.

우유 lipase의 전형적인 최적 pH는 알칼리측으로 pH 8.0과 pH 9.0 범위에 있는 것으로

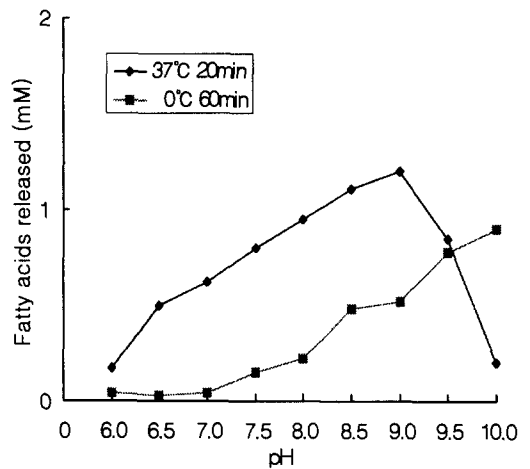


Fig. 3. Effects of pH on the activity of purified lipase for homogenized milk. The buffers used were Tris-maleate for pH 6~7, Tris-HCl for pH 7.5~8.5 and glycine-NaOH for pH 9~10.

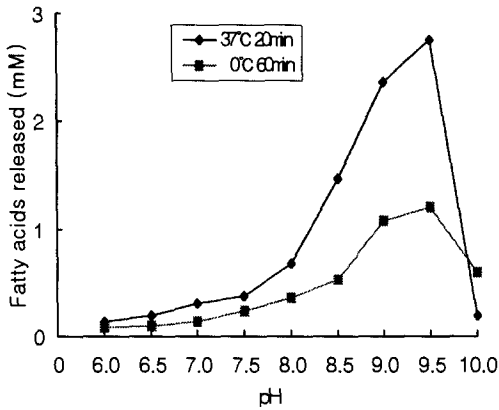


Fig. 4. Effects of pH on the activity of purified lipase for coconut oil contained 1% bovine serum albumin. The buffers used were Tris-maleate for pH 6~7, Tris-HCl for pH 7.5~8.5 and glycine-NaOH for pH 9~10.

알려져 있다⁽¹⁸⁾. 따라서, 지방분해는 pH가 높을수록 또한 온도가 높을수록 촉진된다고 생각된다. 그러나, 실제 반응에서는 pH 및 온도의 상승과 함께 lipase 활성도 반드시 증가한다고 할 수 없다. 그 이유는 효소의 안정성이 pH 및 온도의 상승에 따라 저하하며, 또한 활성촉진제 및 활성저해제 등 다양한 인자들이 효소의 활성에 영향을 미치기 때문이다. 정제 lipase를 사용하여 균질화 우유중의 유지방을 기질로 하였을 경우 반응온도 37°C에서는 pH 9.0에서 최대 활성을 나타내었으나, 0°C의 경우는 최대 활성을 나타내지 않고 pH 증가와 함께 활성이 증가하였다(Fig. 3). 그러나, 장쇄 지방산을 함유한 야자유와 같은 단순한 기질에 BSA를 첨가한 기질을 사용하였을 경우는 반응온도 37°C와 0°C 모두 pH 9.5에서 최대 활성을 나타내었다(Fig. 4). 이와 같이 장쇄지방산을 함유한 기질에 BSA의 첨가는 BSA가 지방산 수용체로서 작용하였을 것으로 생각된다. 본 실험의 결과에서와 같이 유지방과 야자유를 기질로 사용하였을 때 반응온도에 따라 최적 pH가 상이한 것은 사용한 기질을 구성하고 있는 지방산 조성의 차이와 반응온도에 따른 고체 지방과 액체 지방의 비율 차이에 의한 것이 원인의 하나로 생각할 수 있다.

Lipase의 안정성에 미치는 pH의 영향

정제 lipase의 안정성에 미치는 pH의 영향을 알아보기 위하여 pH 7.5~10.0의 완충액에 lipase를 첨가하여 각 반응온도에서 일정시간 유지한 후 lipase활성을 측정하였다(Table 1). 37°C에서 20분간 유지시켰을 경우 활성(pH 8.5에 있어서의 활성을 100%로 하였을 경우)은 pH의 증가에 따라 현저하게 저하하였다. pH 10.0에서 37°C로 20분간 효소를 유지하였을 경우 lipase의 활성은 pH 8.5때의 활성에 비하여 13%로 감소하였다. 그러나, 4°C에서 60분간 lipase를 유지하였을 경우 pH 7.5~pH 10.0의 범위에서 활성은 안정하였다.

효소의 최적 pH와 함께 효소의 안정성에 미치는 pH의 영향도 효소의 성질을 이해하는데 있어 중요한 요인의 하나이다. 정제 lipase의 안정성은 첨가한 단백질, 온도 및 pH의 변화에 따라서 크게 영향을 받는다. Lipase를 저온에서 유지시킬 경우 높은 pH에서도 안정하며⁽⁹⁾, 활성 저해제나 촉진제의 영향이 적다⁽¹⁹⁾.

Lipase의 안정성을 검토한 결과(Table 1) 4°C에서 처리하였을 때 lipase는 높은 pH에서도 안정하였으며, 최적온도(37°C)에서 처리한 lipase는 불안정한 결과를 나타내었다. 이와 같이 저온에 유지했던 lipase가 안정한 것은 반응온도 0°C에서 pH의 증가와 함께 활성이 증가한 결과의 원인 중 하나로 생각된다. Lipase 활성에 미치는 pH의 영향은 효소의 순도, 기질의 종류, 반응온도와 측정조건의 차이, 또한 이들 요인들에 의한 효소 안정성의 변화 등 다양한 인자가 관여한다. 따라서 측정조건이 상이한 각 연구자들의 연구결과를 단순 비교하는 것은 문제가 있다고 하겠다. 또한 원유의 저온 저장

Table 1. Effect of pH on the stability of purified lipase

pH	Relative activity (%)	
	37°C	4°C
7.5	98	92
8.5	100	100
9.0	67	85
9.5	33	95
10.0	13	94

The lipase activities are expressed as percentages of the maximum activity (pH 8.5).

중 발생하는 지방분해의 메카니즘을 구명하기 위해서는 저온에서의 lipase특성에 대하여 보다 많은 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

요 약

유지방구로부터 분리 정제한 lipase의 활성과 안정성에 미치는 pH의 영향을 야자유와 균질유를 기질로 하여 조사하였다. 효소원으로 buttermilk를 사용하였을 경우는 반응온도 37°C에서 야자유, 균질유 모두 pH 9.5에서 최대 활성을 나타내었으며, 전형적인 중형의 pH의존 곡선을 나타내었다. 그러나 반응온도 0°C에서는 pH 10.0까지 활성이 증가하였다. 정제 lipase를 사용한 경우는 반응온도 37°C에서 균질유를 기질로 사용하였을 때 종 모양의 곡선을 나타내었으며, 최대 활성은 pH 9.0에서 나타났다. 반응온도 0°C에서는 pH 10.0까지 활성이 계속 증가하였다. BSA를 첨가한 야자유를 기질로 사용한 경우는 반응온도 37°C, 0°C 모두 최대 활성이 pH 9.5에 나타났으며, pH 10.0에서는 활성이 현저하게 저하하였다. 정제 lipase의 안정성에 미치는 pH의 영향은 온도에 따라 차이가 있었다. 37°C에서 20분간 유지시켰을 경우의 활성은 pH의 증가에 따라 현저하게 저하하였다. pH 10.0에서 37°C로 20분간 효소를 유지하였을 경우 lipase의 활성은 pH 8.5 때의 활성에 비하여 13%로 감소하였다. 그러나, 4°C에서 60분간 효소를 유지하였을 경우는 lipase 활성이 pH 7.5~10.0의 범위에서 안정하였다.

참고문헌

1. Olivecrona, T. : Biochemical aspects of lipolysis in bovine milk. *Int. Dairy Fed. Doc.*, 118, 19 (1980).
2. Nilsson-Ehle, P., Garfinkel, A. S. and Schotz, M. C. : Lipolytic enzymes and plasma lipoprotein metabolism. *Ann. Rev. Biochem.*, 49, 667 (1980).
3. Quinn, D., Shirai, K. and Jackson, R. L. : Lipoprotein lipase : Mechanism of action and role in lipoprotein metabolism. *Prog. Lipid Res.*, 22, 35 (1983).

4. Fielding, C. J. : Kinetics of lipoprotein lipase activity : Effects of the substrate apoprotein on reaction velocity. *Biochim. Biophys. Acta.*, 316, 66 (1973).
5. Bimpson, T. and Higgins, J. A. : The effect of pH, sodium chloride and protamine sulphate on the formation of a complex between rat adipose-tissue lipoprotein lipase and chylomicrons. *Biochim. Biophys. Acta.*, 187, 447 (1969).
6. Fielding, C. J. and Fielding, P. E. : Mechanism of salt-mediated inhibition of lipoprotein lipase. *J. Lipid Res.*, 17, 248 (1976).
7. Bengtsson, G. and Olivecrona, T. : The effects of pH and salt on the lipid binding and enzyme activity of lipoprotein lipase. *Biochim. Biophys. Acta.*, 751, 254 (1983).
8. Bengtsson, G. and Olivecrona, T. : On the pH dependency of lipoprotein lipase activity. *Biochim. Biophys. Acta.*, 712, 196 (1982).
9. 若浜有子, 齊藤善一 : 牛乳のリポタンパク質リパーゼ活性におよぼすpHの影響. *酪農科學. 食品の研究*, 38, 225 (1989).
10. 金居猷 : 혈청성분이 우유 유지방구 유래 lipase의 활성에 미치는 영향. *한국낙농학회지*, 18, 121 (1996).
11. 金居猷, 齊藤善一, 三河勝彦 : 牛乳의脂肪球から分離したリパーゼの活性におよぼす添加物の影響. *酪農科學. 食品の研究*, 41, 133 (1992).
12. Saito, Z. : Application of the phenol-red method for investigations on the lipolysis of raw milk. *Jap. J. Zootech. Sci.*, 50, 710 (1979).
13. Posner, I. : A functional model of the lipoprotein lipase system. *Acta Cient Venez.*, 31, 318 (1980).
14. Bengtsson, G. and Olivecrona, T. : Lipoprotein lipase, mechanism of product inhibition. *Eur. J. Biochem.*, 106, 557 (1980).
15. Cartier, P., Chilliard, Y. and Paquet, D. : Inhibition and activating effects of skim

- milks and proteose-peptone fractions on spontaneous lipolysis and purified lipoprotein lipase activity in bovine milk. *J. Dairy Sci.*, 73, 1173 (1990).
16. Cartier, P. and Chilliard, Y. : Effects of different skimmilk fractions on activity of cow milk purified lipoprotein lipase. *J. Dairy Sci.*, 69, 951 (1986)
17. 김거유, 권일경, 강창기, 고준수 : 유지방구로부터 분리한 lipase의 안정성과 활성화에 미치는 casein의 영향. 한국낙농학회지, 16, 155 (1994).
18. Olivecrona, T. and Bengtsson, G. : "Lipases", ed. by Borgstrom, B. and Brockman, H. L., Elsevier Pub. Co., Amsterdam, Neth, p206 (1984).
19. 若浜有子, 齊藤善一 : 牛乳のリポタンパク質リパーゼにおよぼす添加物の影響. 酪農科學. 食品の研究, 38, 15 (1989).

(2000년 5월 2일 접수)