

## Lipase 효소촉매에 의한 대두유의 가수분해

이 정 태 · † 김 의 용

서울시립대학교 화학공학과

(접수 : 2008. 7. 8., 게재승인 : 2008. 12. 15.)

## The Hydrolysis of Soybean Oil by Lipase Enzyme Catalyst

Jeong Tae Lee and Eui Yong Kim†

Department of Chemical Engineering, University of Seoul, Seoul 130-743, Korea

(Received : 2008. 7. 8., Accepted : 2008. 12. 15.)

The hydrolysis reaction of soybean oil was conducted experimentally by various source enzymes. The analytical result of hydrolysate of soybean oil showed that the compositions were linoleic acid, olic acid, palmitic acid, and stearic acid in order. The enzymes CR-E and CC-E from *Candida rufosa* and *Candida cylindracea* had two fold or more hydrolysis conversions than those of Lipase 16, Novozyme 871, and Lipolase-100L under the same conditions. Therefore CR-E and CC-E were selected for further experiments. These two enzymes had similar ranges of optimum conditions as follows: pH 3-6, 35-45°C, and water to soybean oil ratio of 3.3 or above. They finally got conversions 95% above.

**Key Words** : Lipase, hydrolysis, soybean oil, fatty acids

### 서 론

지방산 생산은 1890년대 Twitchell process가 개발된 이래 가수분해 공정에 의해 크게 발전해 왔다. 1940년대 P&G사에서 연속식 반응기를 개발하였고, fat splitting process가 개발되어 산업에 이용되면서부터 본격적으로 시작되었다(1, 2). 이렇게 생산된 지방산은 직접 제품으로 사용되기 보다는 아마이드류, 니트릴류, 알코올류, 아민류, 윤활유 등을 생산하기 위한 중간물질 또는 계면활성제, 페인트, 비누, 고무 등의 원료로 사용되면서 그 수요가 크게 증가되어 왔다(3, 4). 지방산의 생산은 대부분 화학촉매에 의한 중 저압 반응 또는 촉매가 없는 경우 고압반응을 시키고 있다. 하지만 이런 화학공정들은 대부분 고온에서 이루어지기 때문에 지방질의 이성질화 반응이나 산화가 일어날 뿐 아니라, 에너지의 소모가 높은 단점을 가지고 있다(5, 6). 이런 이유 때문에 화학공정들은 생물학적 촉매인 효소에 의한 지방산 생산 공정으로 전환되고 있는 추세이다(7, 8). 효소에 의한 지방산의 생산 공정은 상온상압 반응으로 에너지의 소비가 적고, 열에 민감한 물질의 생산에 유리하다. 지방산의 가수분해 반응에 가장 널리 사용되는 Lipase는 식물체, 박테리아, 혈장 등에서 쉽게 얻을

수 있지만, 효소의 생산비용이 높고 가수분해가 불완전하게 일어날 수 있는 단점이 있다(9). 본 연구에서는 지방산 생산을 위한 촉매로 *Candida cylindracea*, *Candida rugosa*, *Thermomyces lanuginosus*로부터 유래된 효소들의 반응활성 고찰을 통해 경제성 있는 촉매를 선정하였고 반응의 최적조건을 찾고자 하였다.

### 재료 및 방법

#### 실험재료

본 실험에서는 대두유 원료로 CJ 제일제당(주)의 식용유를 사용하였으며, 효소는 *Thermomyces lanuginosus*에서 추출한 Novo사의 Novozyme 871, (주)비전바이오켐의 Lipase 16, Lipolase 100-L, *Candida rugosa*에서 추출한 효소 (CRE)와 Meito sanyo사의 *Candida cylindracea*에서 추출한 효소 (CCE)를 사용하였다.

#### 대두유의 가수분해 반응

대두유의 가수분해 반응을 위해 20 ml의 vial을 사용하였다. 반응은 pH, 온도, 물량, 효소 농도, 대두유 농도를 변화시켜 가수분해 실험을 실시하였으며, 반응의 절차는 다음과 같았다. Lipase 일정량을 증류수 5 ml에 녹여 그중 0.1 ml을 취해 20 ml vial에 넣고, 증류수와 대두유 일정량을 첨가하여 혼합시킨 후 shaking incubator에서 150 rpm, 30°C로 반응을 시작하였다. 교반을 시작하는 시점을 반응시작 시간으로 하여 일정시간 마다

† Corresponding Author : Department of Chemical Engineering,  
University of Seoul, Seoul, 130-743, Korea  
Tel : +82-2-2210-2590, Fax : +82-2-2216-0570  
E-mail : eykim@uos.ac.kr

시료를 0.3 ml 취해 원심 분리하여 상층액의 산가를 측정하여 fatty acid 함량을 계산하였다. 특별한 언급이 없는 한 반응시간은 6시간으로 고정하였다.

### Lipase의 활성도 측정

효소의 활성도는 pNPP (p-nitrophenylpalmitate)를 이용하여 측정하였다. Acetonitrile에 녹여 만든 50 mM p-NPP를 냉동 보관하였으며, 측정 시마다 25  $\mu$ l를 취해 ethanol 475  $\mu$ l와 Tris-HCl buffer 9500  $\mu$ l에 녹여 이종 1 ml과 sample 50  $\mu$ l를 섞어 UV spectrophotometer로 410 nm에서 측정하였다.

### 지방산의 정성분석 방법

지방산은 시료를 Morrison(10)의 방법에 따라 다음과 같이 전자처리 한 후 GC 분석하였다. 시료 50 mg을 screw cap tube에 넣은 후 benzene 1.5 ml와 BF<sub>3</sub> methanolic solution (12 w/v%) 1.5 ml를 가하여 100°C에서 한 시간 동안 메틸화 반응을 시켰다. 그 후 증류수 2 ml와 hexane 5 ml를 첨가하여 완전 혼합시킨 후 정치시켜 상층액을 취하여 GC 분석하였다. 지방산 분석의 표준물질은 Sigma사의 palmitic, stearic, oleic, linoleic acid를 사용하였다. Fig. 1은 지방산 표준물질을 GC로 분석한 결과이다.

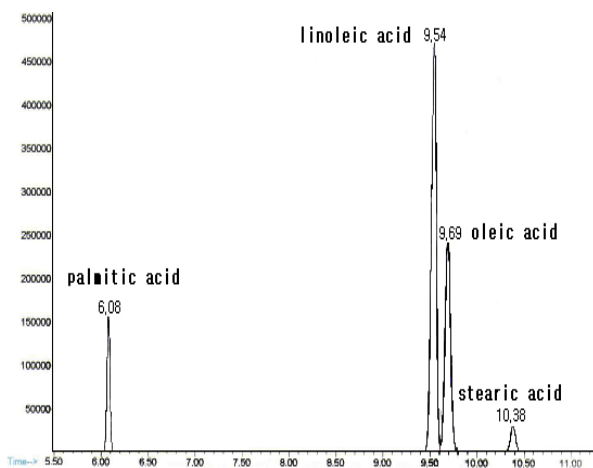


Figure 1. GC analysis of fatty acids in the standard sample.

### 산가측정 방법

KSM 0065법을 이용하여 지방산의 산가 (acid value)를 측정하였다. 시료 0.05 g을 취한 후에 ether-ethanol 혼합용액 10 ml 및 지시약으로 페놀프탈레인 용액 몇 방울을 가하고 물증탕에서 시료가 완전히 녹을 때까지 충분히 흔들어서 섞었다. 여기에 0.1 N-KOH·ethanol 용액으로 적정하여 지시약의 미홍색이 30초 정도 유지되었을 때를 종말점으로 하였다.

산가는 다음 식에 의해 산출하였다.

$$\text{Acid value} = \frac{B \times F \times 5.611}{S}$$

B : 적정에 사용한 0.1 N KOH·ethanol 용액의 부피 (ml)

F : 0.1 N-KOH·ethanol 용액의 농도계수

S : 시료의 무게 (g)

5.611 : KOH의 식량

## 결과 및 고찰

### 지방산의 조성과 효소의 선정

대두유는 식품으로의 용도 뿐 아니라 비누, 플라스틱, 페인트, 잉크, 바이오디젤 생산을 위한 기반이 되는 재생 가능한 원료물질로서 일반적으로 palmitic acid, stearic acid, oleic acid, linoleic acid, linolenic acid 등 5종류의 지방산으로 구성되어 있다. 본 실험을 통해 원료물질인 대두유를 산 가수분해하여 지방산의 함량을 분석한 결과 linoleic acid의 함량이 51.3%로 가장 높았고, 다음으로 oleic acid 34.5%, palmitic acid 10.3%, stearic acid 3.1%의 순으로 분석되었다. 대두유를 구성하고 있는 지방산의 구성비에 따라 녹는점, 산화안정성, 화학반응에 따른 작용기의 특성이 다르기 때문에 원하는 특정 지방산의 함량을 높이기 위한 기초 연구들이 활발히 진행되고 있다(11). DuPont사의 경우 유전자 조작을 통한 작물의 개량에 의해 oleic acid의 함량을 80%까지 올린 바 있다(12).

다음은 지방산을 생산하기 위한 적정효소를 선택하기 위해 증류수 10 g, 대두유 5 g에 동일한 활성을 갖는 양의 효소들을 첨가하여 shaking incubator에서 6시간 반응시켰으며, 그 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 에스테르화 반응에 관여하는 효소로 알려진 Lipase 16, Novozyme 871과 Lipolase-100 L의 경우 반응초기 빠른 속도로 가수분해 되었지만 반응시간이 경과하면서 반응이 지연되어 최종적으로 최대 40%이내의 낮은 지방산 전환율을 나타내었다. 반면에 기질특이성이 적은 것으로 알려진 *Candida rugosa*와 *Candida cylindracea*에서 유래된 효소인 CR-E와 CC-E의 경우 Lipase 16, Novozyme 871과 Lipolase-100 L에 비하여 대두유의 가수분해 활성이 2배 이상 높게 나타나 지방산 전환율이 각각 87, 91%가 되었다. 따라서 *Candida rugosa*와 *Candida cylindracea*에서 유래된 전환율이 높은 효소 CR-E와 CC-E를 선정하여 반응조건 최적화에 대한 실험을 수행하였다.

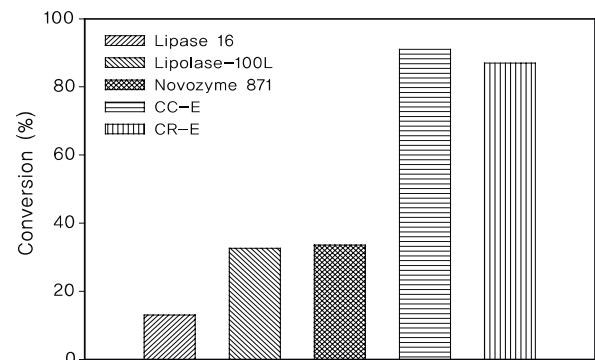


Figure 2. Hydrolysis reaction conversion according to enzyme types.

### pH의 영향

반응물의 초기 pH의 변화가 가수분해반응 전환율에 미치는 영향을 고찰하기 위한 실험을 하였다. 온도 30°C, 대두유 5 g, lipase는 대두유 5 g에 대하여 동일한 활성을 갖도록 *Candida rugosa* 유래 효소 CR-E는 0.4 w%, *Candida cylindracea* 유래 효소 CC-E는 0.16 w%를 각각 첨가하고, 0.2 M citric acid/0.2 M tris-HCl buffer solution (10 g)을 이용하여 초기 pH를 3~8의 범위에서 변화시켰다. 그 결과를 Fig. 3에 나타내었는데, CR-E는 pH 3~5 범위에서는 높은 반응 전환율을 보였으나 6이상

에서는 전환율이 급격하게 감소하여 pH 8에서는 거의 반응이 일어나지 않았다. CC-E의 경우도 비슷한 결과를 보여 pH 3~6에서 활성이 우수한 것으로 나타났다. 따라서 두 종류의 미생물로부터 유래된 효소반응의 경우 pH 3-6의 범위 내에서 가수분해 반응의 전환율이 높은 것으로 조사되었다.

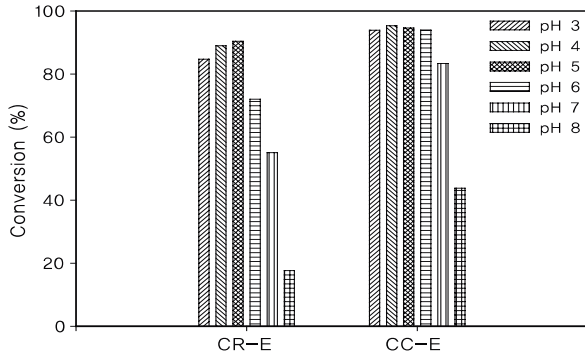


Figure 3. The effect of pH on the hydrolysis reaction conversion by CR-E and CC-E.

온도의 영향

다음은 반응온도가 가수분해반응 전환율에 미치는 영향을 고찰하기 위한 실험을 하였다. 증류수 10 g, 대두유 5 g, lipase는 대두유 5 g에 대하여 *Candida rugosa* 유래효소 CR-E 0.4 w%, *Candida cylidracea* 유래효소 CC-E 0.16 w%를 첨가한 후 온도를 25°C에서 40°C까지 5°C씩 변화를 주어 생성된 지방산의 함량을 측정하였으며 그 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 결과적으로 CR-E의 경우 30-45°C에서 전환율의 차이가 거의 없이 91%의 전환율을 가졌으며 25°C에서는 70% 미만의 낮은 전환율을 보였다. CC-E의 경우 비슷한 결과를 보였으나, CR-E의 경우에 비해 최적적인 온도의 범위가 35-45°C로 좁은 것으로 나타났다.

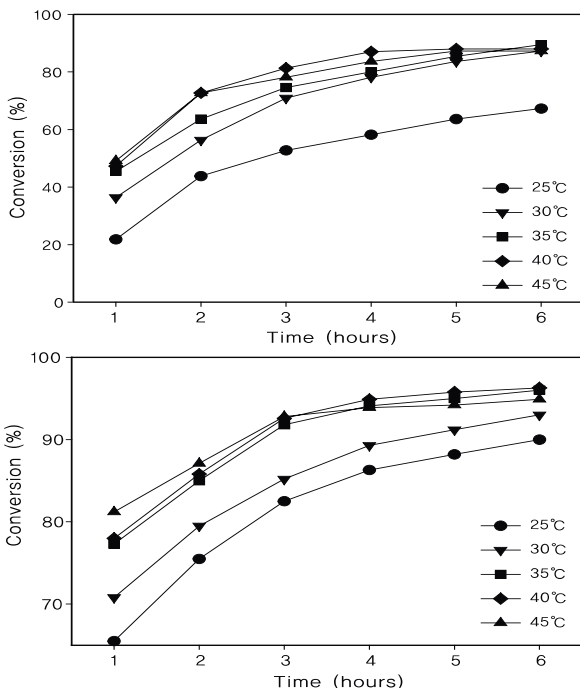


Figure 4. The effect of temperature on the hydrolysis reaction by CR-E and CC-E.

기질의 중량비에 따른 영향

일정한 효소농도 하에서 반응물인 물과 대두유의 중량비가 전환율에 미치는 영향을 살펴보았으며 그 결과를 Table 1에 나타내었다. 반응온도는 35°C, 반응초기 pH는 6.0이었으며, 반응은 6시간 시켰다. CR-E와 CC-E 모두 비슷한 결과를 보여 물 : 대두유의 비율이 3.3 : 1 이상인 경우 98% 이상의 높은 전환율을 갖는 것으로 나타났다.

Table 1. The effect of water to soybean oil ratio on the hydrolysis reaction by lipases from *Candida rugosa* and *Candida cylindracea*

Water to soybean oil wt. ratio	Conversion (%)	
	<i>Candida rugosa</i>	<i>Candida cylindracea</i>
2.6 : 1	92.4	94.0
2.9 : 1	95.7	98.5
3.3 : 1	98.1	99.5
3.7 : 1	99.0	98.4
4.3 : 1	99.4	98.2

요 약

원료물질인 대두유를 산가수분해하여 지방산의 함량을 분석한 결과 linoleic acid, oleic acid, palmitic acid, stearic acid의 함량 순으로 분석되었다. 동일한 조건하에 대두유의 가수분해반응 전환율을 조사한 결과 *Candida rugosa*와 *Candida cylindracea*에서 유래된 효소인 CR-E와 CC-E가 Lipase 16, Novozyme 871과 Lipolase-100 L보다 2배이상 높았다. 따라서 CR-E와 CC-E를 선정하여 반응조건에 대한 실험을 수행하였다. CR-E와 CC-E의 경우 비슷한 결과를 보여, pH 3~6, 35-45°C, 물과 대두유의 중량비가 3.3 이상이었을 때가 최적적인 반응조건이었으며 95% 이상의 높은 전환율을 나타내었다.

감 사

이 논문은 2006년도 서울시립대학교 학술연구조성비에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- http://www.arserrc.gov/techtrans/Technologies/Fats%20and%20Lipids/techwhey.htm.
- Harry W. Lawson, (1985), Standards for fats & oils, 8, 825-827.
- http://www.arserrc.gov/techtrans/Technologies/Fats%20and%20Lipids/techSplitting.htm.
- http://www.fao.org/DOCREP/003/X6899E/X6899E03.htm.
- Tahoun, M. K., M. F. El-Kadey, and A. A. Wahba, (1987), Hydrolysis of synthetic and natural triglycerides by an intracellular lipase from *Aspergillus niger*, *FERR-WISS. Technol.*, **89**, 261-263.
- http://www.au-kbc.org/beta/bioproj2/uses.html.
- Yamamoto, K, and Fujiwara N., (1995), The Hydrolysis of Castor-oil Using a Lipase from *Pseudomonas* sp, F-B-24 Positional and Substrate-Specificity of the Enzyme and Optimum Reaction Condition, *Biosci. Biotech. Bioch.*, **59**, 1262-1266.

8. Murty, V. Ramachandra Bhat, Jayadev Muniswaran, P. K. A. (2002), Hydrolysis of rice bran oil using immobilized lipase in a stirred batch reactor, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, **7**, 367-370.
9. Taylor, F., M. J. Kurantz, and J. C. Craig, Jr, (1992), Kinetics of Continuous Hydrolysis of Tallow in a Multi-Layered Flat-Plate Immobilized-Lipase Reactor, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **69**, 591-594.
10. Morrison, W. R. and L. M. Smith (1964), Preparation of Fatty Acid Methyl Esters and Dimethylacetals from Lipids with Boron Fluoride- Methanol, *J. Lipid Res.*, **5**, 600-608.
11. Cahoon, E. B., E. F. Marrillia, K. L. Stecca, S. E. Hall, D. C. Taylor, and A. J. Kinney (2000), Production of fatty acids components of meadowfoam oil in somatic soybean embryos, *Plant Physiology*, **124**, 243-251.
12. Kinney, A. J. (1997), Genetic engineering of oilseeds for desired traits, In *Genetic engineering* Vol. 19, J. K. Setlow Ed., pp149-166, Plenum Press, New York.