Food Engineering Progress
Vol. 9, No. 1. pp. 45~51 (2005.2)

Lipolase-100T의 물고기 기름 가수분해에 대한 수식모형개발

김현수 · 김원호 · 박지숙 · 허병기
인하대학교 생물공학과

Development of Mathematical Model for Hydrolysis of Fish Oil by means of Lipolase-100T

Hyun-Su Kim, Won-Ho Kim, Ji-Suk Park, Byung-Ki Hur*
Department of Biological Engineering, Inha University

Abstract

In this study, a mathematical model such as $S= -\alpha\ln(t)+\beta$ was deduced between the model of triglyceride, diglyceride, and monoglyceride and the hydrolysis time, when the fish oil was hydrolyzed by the enzyme, Lipolase-100T from Aspergillus oryzae. Therefore the equation of reaction rate of these glycerides, $v = \gamma\exp\left(\frac{S}{\alpha}\right)$, was obtained from the above mathematical model. The mole of free fatty acids produced from triglycerides, diglycerides, and monoglycerides was expressed as a logarithmic function of hydrolysis time, FFA = a ln(*t*)+b. The functional relationship between the hydrolysis yield of C14:0, C16:0, C20:5, and C22:6 and the hydrolysis time was also deduced as a logarithmic function, y = c ln(*t*) +d. In order to evaluate the accuracy of the above mentioned equations, error analysis was performed between the calculated values of these equations and the actual measured values. For all the cases, the average errors was distributed in the range of less than 10%.

Key words : mathematical model, glyceride, hydrolysis time, free fatty acid, hydrolysis yield

서 론

생체촉매 리파제(lipase)는 지질과의 반응특성에 따라서 1,3-위치 특이성 리파제 및 아실체인 특이성 리파제 (Tanaka *et al*., 1992; Yadwad *et al*., 1991) 등으로 구분된다. *Rhizopus Javanicus* (Boswinkel *et al.*, 1996), *Rhizopus niveus* (Yadwad *et al.*, 1991) 및 *Aspergillus niger* (Tanaka *et al*., 1992) 유래의 리파제는 글리세라이드의 1과 3의 위치에 촉매활성을 나타낸다. *Mucor miehei* (Li와 Ward, 1993), *Candida cylindracea*와 *Rhizopus arrhizus* (Mukherjee *et al*., 1993) 유래의 리파제는 글리세라이드 분자로부터 특수한 형태의 지방산을 가수분해하는 아실체인 특이성을 나타내고 있다.

현재까지 리파제의 특이성을 이용하여 특정 지방산을 미반응 모노-, 디- 및 트리글리세라이드 혼합물 내로 농축시키거나 유리지방산으로 가수분해시킴으로써, 인체에 유용한 ω-3다중불포화 지방산을 고농도로 농축시키는 공정 개발에 많은 연구가 수행되고 있다(Jin과 Hur, 1998; Shimada *et al*., 1994). 그러나 가수분해과정동안 디글리세라이드 및 모노글리세라이드 생성속도는 물론 트리글리세라이드, 디글리세라이드 및 모노글리세라이드로부터 생성되는 유리지방산의 생성속도 또한 규명되어 있지 아니하다(Hur *et al.*, 1999).

본 연구에서는 *Aspergillus oryzae* 유래의 리파제를 사용하여 물고기 기름을 가수분해 시켰을 때 생성되는 디글리세라이드 및 모노글리세라이드의 생성 속도는 물론 트리글리세라이드, 디글리세라이드

Corresponding author: B. K. Hur, Professor, Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea.
Phone: 032-860-7512, Fax: 032-860-7512
E-mail: biosys@inha.ac.kr

와 모노글리세라이드로부터 생성되는 유리 지방산의 양과 속도를 규명하려고 하였다. 또한 물고기 기름을 구성하는 15종류의 지방산 중 포화지방산 C14:0 및 C16:0과 ω-3 다중불포화지방산 C20:5 (eicosapentanoic acid, EPA)와 C22:6 (docosahexanoic acid, DHA)의 가수분해율에 대한 수학적 모델을 도출하였다.

재료 및 방법

재료

본 연구에서 사용한 리파제는 Aspergillus oryzae 유래의 Lipolase-100T로 NOVO Nardisk社 제품이다. 물고기 기름은 노르웨이 국적의 LiPRO AS社 제품으로 EPA와 DHA를 각각 17wt%와 11wt% 함유하고 있다.

가수분해, 탈산 및 에스테르화

가수분해 반응을 위한 증류수와 물고기 기름의 부피비는 1대 1로 하였다. 반응온도는 50°C, 교반속도는 250 rpm 그리고 가수분해 반응시간은 120 hr로 하였다. 반응시간 0.5, 2, 4, 7, 10, 15, 24, 48, 72 및 120 hr에서 시료를 채취하여 시험관에 주입한 후 끓는 물에 담그어서 효소의 활성을 정지시켰다. 준비된 시료로부터의 탈산방법은 한국표준협회 KSM2731 (한국공업규격 KSM2731, 1985)을 사용하였다. 시료 0.6 mL에 아세톤 3 mL와 헥산 3 mL을 주입한 후, 0.2 N NaOH 용액 100 mL로 적정하여 유리지방산을 제거하였다. 하층을 제거한 후 상층부를 증류수로 수차례 수세하였다. 윗층의 용매를 증발시켜 얻은 모노-, 디- 및 트리글리세라이드 혼합물을 Lepage와 Roy(Lepage와 Roy, 1984) 방법을 변형하여 에스테르화 시켜 분석시료를 준비하였다.

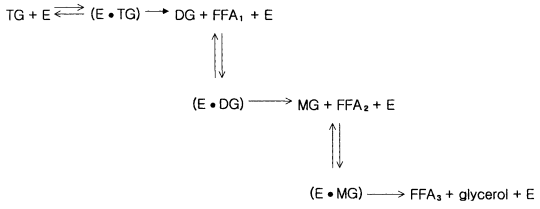
분석

Hewlette-Packard社의 HP 6890 series GC system을 사용하여 에스테르화된 혼합물을 분석함으로써, 미반응 트리-, 디- 및 모노글리세라이드 혼합시료 내의 지방산 조성을 분석하였다. 이때 사용한 column은 HP 19091J-413이었으며, detector는 FID를 사용하였다.

생성물 내의 트리-, 디-, 모노글리세라이드 및 유리지방산의 조성은 TLC-FID를 사용하여 분석하였다. 반응시간 별로 채취한 시료를 100°C 끓는 물에서 효소의 반응을 정지시킨 후, 3,600 rpm에서 15분간 원심분리하고, 기름층에서 100 μL의 시료를 취하여 10 mL의 클로로포름에 녹인 후, 박층크로마토그래피(CHROMAROD-SⅢ)에 시료 1 μL를 점적하여 100 mm의 높이로 전개하였다. 전개용매로는 부피비가 70:30:2인 벤젠, 클로로포름, 아세트산의 혼합물을 사용하였다. TLC-FID의 분석에서 수소 유속은 160 mL/min, 공기 유속은 2.0 L/min으로 하였으며, scan speed는 30초로 하였다. 결과처리는 일본 IATRON社의 IATROCODER TC-21을 사용하였다.

반응메카니즘

물고기 기름은 글리세롤 한 분자에 서로 다른 종류의 지방산이 세 분자 결합되어 있기 때문에 글리세라이드 한 분자에는 결합 위치가 서로 다른 지방산 세 분자가 존재하게 된다. 따라서 기질의 가수분해에 대한 효소의 반응 메카니즘은 단일기질반응 및 복수기질 반응에 대한 반응 메카니즘과 차이를 나타나게 된다(Hur *et al.*, 1999). 따라서 본 연구에서는 지질의 가수분해 반응에 대한 속도론적 해석을 위하여, 반응 메카니즘을 다음과 같이 가정하였다.



위 식에서 TG는 트리글리세라이드, DG는 디글리세라이드, MG는 모노글리세라이드, E는 효소, FFA_1, FFA_2 및 FFA_3는 유리지방산을 의미한다. 위의 반응 메카니즘에 대한 각 성분의 생성 또는 감소속도를 나타내면 다음 식과 같다.

$$-\frac{d[TG]}{dt} = \frac{d[FFA_1]}{dt} \quad (1)$$

$$\frac{d[DG]}{dt} = \frac{d[FFA_1]}{dt} - \frac{d[FFA_2]}{dt} \quad (2)$$

$$\frac{d[MG]}{dt} = \frac{d[FFA_2]}{dt} - \frac{d[FFA_3]}{dt} \quad (3)$$

$$\frac{d[FFA_t]}{dt} = \frac{d[FFA_1]}{dt} + \frac{d[FFA_2]}{dt} + \frac{d[FFA_3]}{dt} \quad (4)$$

결과 및 고찰

글리세라이드의 반응속도

효소의 생체촉매 반응에 대한 반응 메카니즘은 1902년 Henri에 의하여 제안되었으며, Michaelin-Menten에 의하여 수정 보완되어 현재까지 단일기질에 대한 효소반응속도 해석에 널리 사용되어지고 있다(Baily와 David, 1986). 효소의 복수기질에 대한 속도론적 이론은 Alberty, Dalziel, Cheland 및 Wong 등에 의하여 정립되었다(서정윤, 1988). 그러나 지질과 같이 한 분자에 여러 종류의 기질이 결합되어 있는 경우에 대한 효소반응 메카니즘과 속도론적 이론은 정확히 구축되어 있지 아니하다. 본 연구에서는 1,3-위치 특이성을 내포하고 있다고 보고 되어있는 Aspergillus oryzae 유래의 효소 Lipolase-100T에 의한 지질의 가수분해 반응속도를 실험적으로 규명하였다.

트리글리세라이드, 디글리세라이드 및 모노글리세라이드의 반응속도를 규명하기 위하여 이들 글리세라이드 mol수와 반응시간과의 관계를 Fig. 1에서 3에 도시하였다. 이 결과를 수식화하기 위하여, 각 성분의 시간에 따른 mol수를 반응시간의 다항식 함수, 지수함수 및 대수함수 등으로 나타내었으며, 각 함수식의 계수는 최소자승법으로 구하였다. 또한 각 함수의 계산값이 실측치를 어느 정도 잘 대변하는지를 평가하기 위하여 다음 식(5)로 정의되는 평균오차를 분석하였다.

$$\text{평균오차(5)} = \frac{\sum_{i=1}^{N}\left[\frac{\text{실측치} - \text{계산치}}{\text{실측치}}\right]_i \times 100}{N} \qquad (5)$$

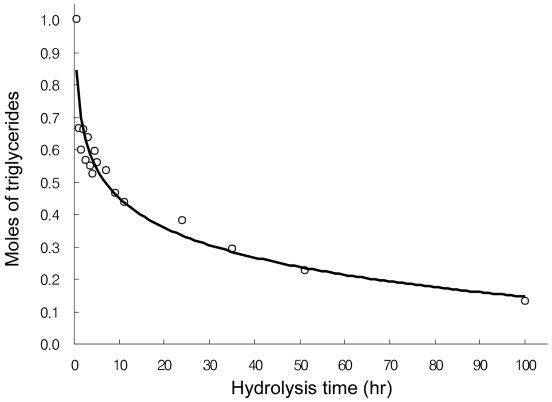


Fig. 1. The moles of triglycerides vs. hydrolysis time.

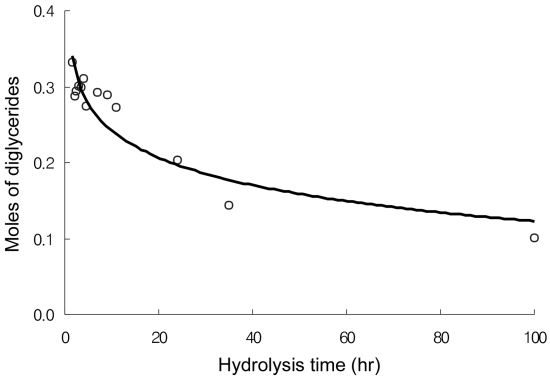


Fig. 2. The moles of diglycerides vs. hydrolysis time.

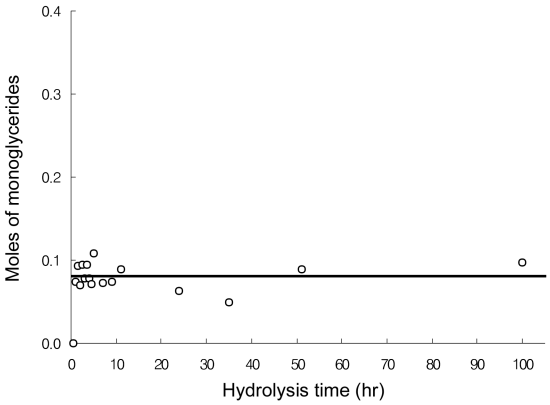


Fig. 3. Moles of monoglycerides vs. hydrolysis time.

위 식에서 N은 반응시간 0 hr에서 100 hr 사이에서 시료를 채취한 횟수를 나타낸다. 본 연구에서는 0.5, 1, 1.5, …, 24, 35, 51 및 100 hr에서 총 17회의 시료를 채취하여 각 시료 채취시간 별로 TG, DG, MG 및 FFA의 조성을 분석하였다. 이 결과에 의하면 다음 식(6)으로 표현되는 대수함수의 계산치와 실측치 사이의 평균오차가 가장 적게 나타났다.

$$S = -\alpha \ln(t) + \beta \qquad (6)$$

위 식에서 S는 각 성분의 mol수, t는 반응 시간, 그리고 α와 β는 상수를 의미한다. Table 1은 트리글리세라이드, 디글리세라이드 및 모노글리세라이드에 대한 식(6)의 계산치와 실측치 사이의 평균오차를 나타내고 있다. Fig. 1 내지 3에서 실선은 Table 1의 수식의 값을 나타내며 각 기호는 실측치를 나타내고 있다.

Table 1. 지질의 가수분해 생성성분 계산식 및 계산치와 실측치 사이의 평균오차

성 분	계 산 식	평균오차
트리글리세라이드	S = -0.1319 ln(t) +0.7539	5.78%
디글리세라이드	S = -0.0559 ln(t) +0.3533	6.29%
모노글리세라이드	S = 0.081	9.11%

식(6)으로부터 트리글리세라이드, 디글리세라이드 및 모노글리세라이드에 대한 반응속도를 구하면 다음 식(7)과 같다.

$$v = -\frac{dS}{dt} = \frac{\alpha}{t} \tag{7}$$

식 (6)으로부터 t를 S의 함수로 구하여 식 (7)에 대입하면 각 성분의 반응속도는 각 성분 mol수의 지수함수로 표현된다.

$$v = -\frac{dS}{dt} = \frac{\alpha}{\exp\left(\frac{\beta}{\alpha}\right)\exp\left(-\frac{S}{\alpha}\right)} = \left[\frac{\alpha}{\exp\left(\frac{\beta}{\alpha}\right)}\right]\exp\left(\frac{S}{\alpha}\right)$$

$$= \gamma\exp\left(\frac{S}{\alpha}\right) \tag{8}$$

식(8)과 Table 1을 이용하여 트리글리세라이드, 디글리세라이드 및 모노글리세라이드에 대한 반응속도식을 구하면 Table 2와 같다.

식(8)에서 S값이 작을 경우, Taylor 멱급수로 전개하면 다음과 같다.

$$v = \gamma\left[e^{(0)} + \frac{1}{\alpha}\frac{e^{(0)}}{1!}S_i + \frac{1}{\alpha^2}\frac{e^{(0)}}{2!}S^2 + \cdots\right] \tag{9}$$

Table 2. 지질의 가수분해 생성성분에 대한 반응속도식

성 분	γ	수 식
트리글리세라이드	0.00043	$v = 0.00043\exp\left(\frac{TG}{0.1319}\right)$
디글리세라이드	0.00010	$v = 0.00010\exp\left(\frac{DG}{0.0559}\right)$
모노글리세라이드		$v = 0$

위 식에서 γ와 S의 값이 작기 때문에 S의 1차 항에 비하여 나머지 항의 값이 작게 된다. 따라서 S의 1차 항을 제외한 나머지 항을 무시하면 식 (9)의 반응속도는 S의 1차 함수가 된다. 이와 같은 특성은 효소반응에 대한 대표적인 속도식인 Michaelis-Menten 식의 특성과 일치하게 된다(Baily와 David, 1986).

지방산의 생성속도

유리지방산은 트리글리세라이드, 디글리세라이드 및 모노글리세라이드의 가수분해로부터 생성된다. 식(1)의 양변에 dt를 곱하고 적분하면, 가수분해 시간에 따른 유리지방산의 mol수 $FFA_1(t)$를 다음과 같이 구할 수 있다.

$$FFA_1(t) = TG(0) - TG(t) \tag{10}$$

위 식에서 TG(0)는 트리글리세라이드 초기 mol수를, TG(t)는 가수분해시간 t에서의 트리글리세라이드의 mol수를 의미한다. 식(10)에 Table 1의 TG(t) 수식을 대입하면 가수분해 시간에 따른 유리지방산의 mol수 $FFA_1(t)$에 대한 식(11)을 구할 수 있다.

$$FFA_1(t) = 0.1319\ln(t) + 0.4061 \tag{11}$$

동일한 방법으로 식(2)내지 (4)로부터 $FFA_2(t)$, $FFA_3(t)$ 및 $FFA_t(t)$를 구하여 Table 3에 나타내었다. Fig. 4의 실선은 Table 3의 수식의 값을, 기호는

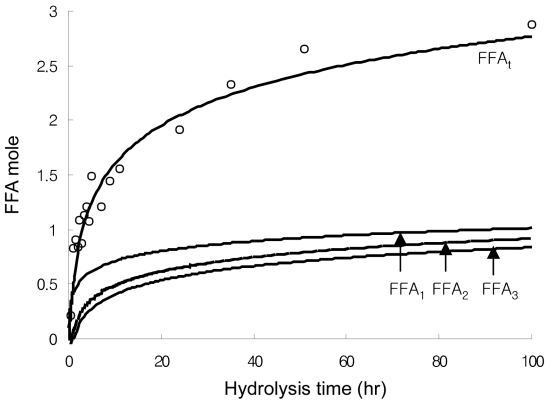


Fig. 4. Hydrolysis time course charges of moles of fatty acids produced from glycerides. ○ : actual measured value of FFAt, ——: calculated curve of FFA_t, FFA_1, FFA_2 and FFA_3.

Table 3. 가수분해시간과 FFA_1, FFA_2, FFA_3 및 FFA_t 사이의 함수관계식

성 분	생성 지방산	함수관계식
트리글리세라이드(TG)	FFA_1	$FFA_1(t) = 0.1319 \ln(t) + 0.4061$
디글리세라이드(DG)	FFA_2	$FFA_2(t) = 0.1878 \ln(t) + 0.0528$
모노글리세라이드(MG)	FFA_3	$t \leq 1.162hr$ $FFA_3(t) = 0 \quad t > 1.162hr$ $FFA_3(t) = 0.1878 \ln(t) - 0.0282$
글리세라이드 혼합물(TG+DG+MG)	FFA_t	$t \leq 1.162hr$ $FFA_t(t) = 0.3197 \ln(t) + 0.4598$ $t > 1.162hr \quad FFA_t(t) = 0.5075 \ln(t) + 0.4307$

FFA_t의 실측치를 나타내고 있다. FFA_t에 대한 계산값과 실측값을 비교 분석하기 위하여 식(5)에 의한 평균오차를 분석하였다. 이 결과 평균오차가 9.09%로, Table 3의 수식이 실측치를 잘 대변하고 있음을 알수 있었다.

지방산의 가수분해율

물고기 기름을 구성하고 있는 15종류의 지방산 중 포화지방산 C14:0과 C16:0 및 ω-3 다중불포화 지방산 C20:5와 C22:6의 가수분해율에 대한 수학적 모형을 유도하였다. 트리글리세라이드 및 디글리세라이드의 반응특성에서 알 수 있듯이 각 지방산의 가수분해 특성도 대수함수관계식으로 표현하는 것이 가장 적절하였다. Fig. 5는 미리스트산의 시간에 따른 가수분해율 측정치와 대수함수관계식에 의한 계산차를 나타내고 있다. 기호는 실측치를 실선은 수식에 의한 계산치를 의미한다. 가수분해시간 100 hr에서 초기 물고기 기름을 구성하고 있던 미리스트산의 80%가 유리지방산으로 가수분해되었으며 식(5)에 의한 평균 오차는 10.54%이였다. Fig. 6은 팔미트산의 시간에 따른 가수분해율을 나타내고 있다. 가수분해 100 hr에서 초기 팔미트산의 70%가 유리지방산으로 가수분해되어 미리스트산보다 가수분해율이 낮았다. Fig. 7은 EPA의 시간에 따른 가수분해율을 나타내고 있다. 가수분해 100 hr에서 초기 EPA의 86%가 가수분해되었다. 이런 결과는 아실체

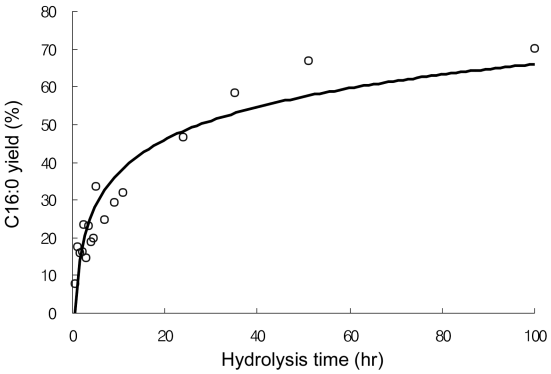


Fig. 6. Comparison of hydrolysis yield of palmitic acid (C16:0) between calculated and actual measured values.

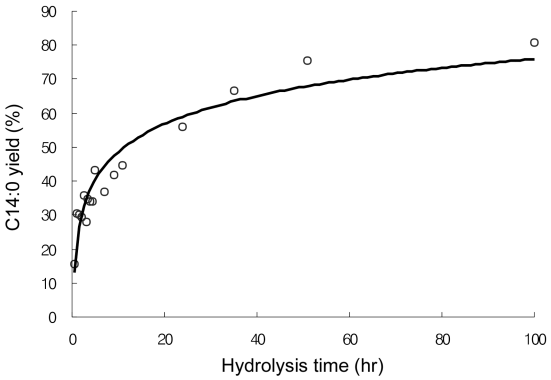


Fig. 5. Comparison of hydrolysis yield of myristic acid (C14:0) between calculated and actual measured values.

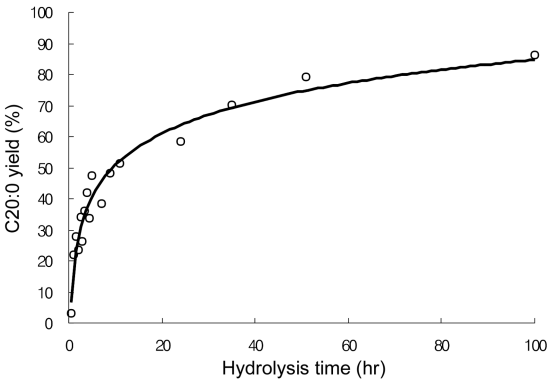


Fig. 7. Comparison of hydrolysis yield of EPA (C20:5) between calculated and actual measured values.

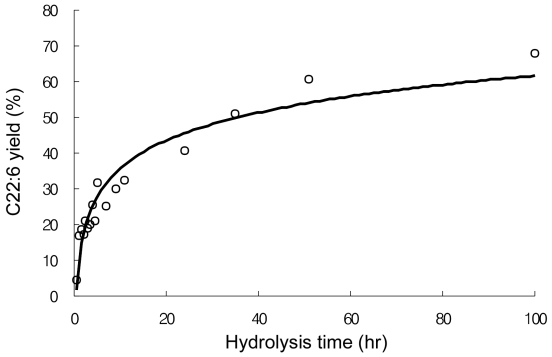


Fig. 8. Comparison of hydrolysis yield of DHA (C22:6) between calculated and actual measured values.

Table 4. 지방산의 가수분해율 계산식과 실측치와의 평균오차

지 방 산	가수분해율(y)의 계산식	평균오차
미리스트산 (C14:0)	y = 11.874 ln(t)+21.262	10.53%
팔미트산 (C16:0)	y = 12.467 ln(t)+8.6163	9.67%
EPA (C20:5)	y = 14.773 ln(t)+16.769	9.08%
DHA (C22:6)	y = 11.286 ln(t)+9.6913	9.76%

인 특이성의 리파제는 포화지방산에 비하여 다중불포화지방산의 가수분해율이 현저하게 낮다는 연구결과와 상반되는 결과로, 본 연구에서 사용한 Lipolase-100T는 아실체인 특이성의 리파제가 아님을 알수 있다(Jin, 1998; Shimada, 1994). Fig. 8은 DHA의 시간에 따른 가수분해율을 나타내고 있다. 이중결합수가 6개이며, 구성탄소수가 22개임에도 불구하고 가수분해 100 hr에서 68%의 가수분해율을 나타내어 C16:0인 지방산의 가수분해율과 거의 같았다. Table 4는 C14:0, C16:0, C20:5와 C22:6의 가수분해율 계산 수식과 식(5)에 의한 평균오차를 나타내고 있다. 이 결과로부터 물고기 기름을 구성하고 있는 각 총 지방산의 가수분해율은 실측치와 평균오차 10%범위 내외에서 대수함수식으로 표현할 수 있다고 해석할 수 있다.

요 약

본 연구에서는 *Aspergillus oryzae* 유래의 리파제를 사용하여 물고기 기름을 가수분해 시켰을 때, 가수분해 시간에 따른 트리글리세라이드, 디글리세라이드 및 모노글리세라이드의 mol수를 대수함수식, $S = -\alpha\ln(t) + \beta$으로 나타냈을 뿐만 아니라, 이들 세종류의 반응속도를 각 성분 mol 수의 지수함수인, $v = \gamma\exp\left(\frac{S}{\alpha}\right)$로 유도하였다. 또한 트리글리세라이드, 디글리세라이드 및 모노글리세라이드로부터 생성되는 유리 지방산의 시간에 따른 mol수를 대수함수, FFA=a lnn(t)+b의 형태로, C14:0, C16:0, C20:5 및 C22:6의 가수분해율도, FFA=c ln(t)+d의 형태로 나타내었다. 이 경우 모두에 대한 측정치와 유도된 수학적 모형에 대한 계산치 사이의 평균오차가 10% 이내의 범위에 분포되어 개발된 수학적 모형인 대수함수식이 실측치를 잘 대변하였다.

감사의 글

본 연구는 해양수산부의 수산특정연구개발사업(과제번호: 20020075)에 의해 수행되었으며 연구비 지원에 감사드립니다.

문 헌

서정윤 (1988), 제4장 복수기질반응, 75-99, 민음사.

한국공업규격 시료유지의 탈산방법 (1985), KSM 2731.

Bailey, J. E. and David, F. O. (1986), Biochemical Engineering Fundamentals, 2nd ed. McGow-Hill, 100.

Boswinkel, G., J. T. P. Derken, 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.

Hur, B. K., D. J. Woo and C. B. Kim (1999), Hydrolysis Mechanisms of Fish Oil by Lipolase-100T, *J. Microbiol. Biotechnol.*, **9**(5): 624-630.

Jin, Y. S. and B. K. Hur (1998), Process Development of Concentration of n-3 PuFAs from Fish Oil by means of Lipase, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **13**: 90-95.

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.

Li, Z. Y. and O. P. Ward (1993), Enzyme Catalyzed Production of Vegetable Oils Containing Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acid, *Biotechnol. Lett.*, **15**: 185-188.

Mukherjee, K. D., I. Kiewitt and M. J. Hills (1993), Substrate Specificies of Lipases in View of Kinetic Resolution of Unsaturated Fatty Acids, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **40**: 489-493.8.

Shimada, Y., K. Marugama, 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**: 951-954.

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.

Yadwad, V. B., O. P. Ward and L. C. Noronha (1991), Application of Lipase to Concentrate the Docosahexaenoic Acid (DHA) Fration of Fish Oil, *Biotechnol. Bioeng*., **38**: 956-959.