

〈研究論文(學術)〉

## 리파제에 의한 트리팔미틴의 가수분해

이난형 · 유효선 · 김성련

서울대학교 가정대학 의류학과  
(1996년 9월 10일 접수)

### The Hydrolysis of Tripalmitin by Lipase

Nan Hyung Lee, Hyo Sun Rhyu and Sung Reon Kim

*Dept. of clothing science, Seoul National University, Seoul, Korea*

(Received September 10, 1996)

**Abstract**—This study was carried out to examine the effect of lipase on the removal of tripalmitin in the various conditions of washing. The relations between the removal and the hydrolysis of tripalmitin by lipase were discussed. The hydrolysis characteristics of lipase were examined by a colorimetric determination of liberated fatty acids as a new assay of lipase in reverse micelles.

The hydrolysis of tripalmitin by lipase was increased with the increase of reaction time and reaction above lipase concentration 150mg/ℓ pH at reaction temperature 40°C.

### 1. 서 론

천연오구는 크게 수용성오구, 지용성오구 및 고형오구로 나뉘어지는데<sup>1-3)</sup> 고형오구는 흙, 먼지, 매연등 환경으로부터 오는 오구가 주를 이루는 것으로, 대부분이 지용성 오구층에 부착되어 있고 섬유와의 결합력이 약하기 때문에 세척시 지용성오구의 제거와 함께 탈락될 수 있다<sup>2,4,5)</sup>.

지용성오구는 피지선으로부터 분비되는 피지가 주를 이루고 있으며, 이러한 지용성 오구는 고형오구를 흡착하여 오염을 촉진하고 의복을 착용하고 세척하는 과정을 반복하는 동안 축적되기 쉬우므로 세척시 지용성 오구의 효과적인 제거는 대단히 중요한 것이라 여겨진다<sup>6-11)</sup>.

지용성 오구중 유리 지방산과 글리세리드는 전체 지용성 오구의 반이상을 차지하고 있는데<sup>2)</sup>, 이 중 극성성분인 유리 지방산은 제거되기 쉬우나 비극성 성분인 글리세리드는 제거가 어려워 세척 후에도 상당량이 그대로 잔존하는 것으로 알려져 있다<sup>12-15)</sup>.

리파제의 트리글리세리드 가수분해반응은 단순한 반응이면서도 효소의 기원에 따라 특이성을 가지는데, 리파제의 특이성으로 가장 잘 알려진 것은, 트리글리세리드의 분해위치에 따른 차이로서 다음 세 가지 형태로 나뉘어진다<sup>16)</sup>.

첫째는, 가수분해시 트리글리세리드의 어떤 부분의 에스테르 결합에도 작용하여, 트리글리세리드를 모노글리세리드, 디글리세리드, 글리세롤 및 유리 지방산으로 가수분해하는 리파제로 여기에는 *Candida*

cylindraceae, *Corynebacterium acnes*와 *Staphylococcus aureus*로 부터 얻은 리파제가 있다<sup>17)</sup>.

둘째는, 글리세리드의 1-과 3- 위치에 있는 에스테르 결합을 가수분해하는 리파제로, 이러한 리파제는 트리글리세리드를 유리 지방산, 1, 2-디글리세리드와 2-모노글리세리드로 가수분해 한다. 그런데 글리세리드의 2- 위치는 화학적으로 불안정하므로 1, 2-디글리세리드와 2-모노글리세리드는 아실전이에 의해 1, 3-디글리세리드와 1-모노글리세리드가 되고 결국에는 1, 3-분해 리파제에 의해 트리글리세리드가 완전히 유리 지방산과 글리세롤로 가수분해된다. 이러한 1, 3-분해 리파제는 미생물에서 얻는 리파제 가운데 가장 흔한 것으로 *Aspergillus niger*, *Mucor javanicus*와 다양한 *Rhizopus* 균으로 부터 얻은 리파제가 이에 속한다<sup>18)</sup>.

세번째는, 트리글리세리드분자로 부터 특별한 종류의 지방산과 결합된 에스테르 결합만을 가수분해하는 리파제로서, *Geotrichum candidum*과 *Penicillium cyclopium*으로 부터 얻은 리파제가 이에 속한다.

따라서, 세제에 배합되는 리파제는 1,3-분해 특이성을 가진 리파제가 주로 사용된다.

리파제 반응에 있어서는 그 작용이 최대가 되는 최적 조건이 존재하게 되는데 대표적인 것으로는 효소농도, pH 및 온도 등의 조건을 들 수 있다.

따라서 본 연구에서는 리파제에 의한 트리팔미틴의 가수분해에 대해서, 효소농도, 트리팔미틴 농도, 반응시간, 반응온도 및 반응액의 pH 가 어떤 영향을 미치는지에 대해 연구하였다.

## 2. 실험

### 2.1 시험포 및 시약

#### 2.1.1 시험포

섬유류 제품의 염색 견뢰도 시험용 첨부백포(KS K 0905, 한국의류시험검사소)를 아염소산 나트륨( $\text{NaOCl}_2$ ) 2g/l, 포름산( $\text{HCOOH}$ ) 2g/l, 질산( $\text{HNO}_3$ ) 2g/l 용액에 액비 30 : 1, 60°C에서 1시간 정련한 후 암모니아수로 중화하고 충분히 수세하여 자연건조하였다. 사용한 시험포의 특성은 Table 1과 같다.

Table 1. Characteristics of fabric

Material	polyester 100%
Weave	plain
Fabric count (ends x picks/5cm)	210 × 191
Yarn number(denier)	75 × 75

#### 2.1.2 시 약

리파제

: *Aspergillus oryzae*로 부터 얻은 alkaline lipase인 Lipolase 100T(Novo IND)를 사용하였다.

Declared activity : 100KLU/G

글리세롤 트리팔미테이트(트리팔미틴)

: 시약일급, 東京化成

글리세롤 트리(1-14C)팔미테이트

: specific activity 60mCi/mmol

radioactive concentration 50μCi/mmol

radiochemical purity 99%

(T.L.C. on Silicagel)

(The Radio Chemical Center, Amersham)

1-monopalmitoyl glycerol : 시약일급, Sigma

1,2-dipalmitoyl glycerol : 시약일급, Sigma

1,3-dipalmitoyl glycerol : 시약일급, Sigma

Sodium bis(2-ethyl-hexyl) sulfosuccinate(AOT)

: Reagent grade, Sigma

2-Amino-2-hydroxy-methyl-1,3-propandiol  
(TRIS)

: Reagent grade, Sigma

2,5-Diphenyl oxazole(ppo)

: scintillation grade, Merck

2,2-p-Phenylene bis-(5-phenyl oxazole) (popop)

: scintillation grade, Merck

Polyethylene glycol mono-p-nonylphenyl ether  
(NPE-10)

: 시약일급, 東京化成

Sodium dodecyl benzene sulfonate(LAS)

: 시약일급, 東京化成

그 밖의 시약은 시약일급을 사용하였다.

2.2 실험방법

2.2.1 리파제에 의한 트리팔미틴의 가수분해<sup>6,9)</sup>와 유리 지방산 정량

50mM 트리팔미틴과 100mM AOT/isooctane-용액을 만든 후 시험관에 이들을 3ml씩 넣는다. 여기에 0.1M TRIS/HCl buffer (pH 9.0)를 가지고 만든 2mM phenol red를 15 $\mu$ l를 첨가하고 0.1N HCl, 0.2N HCl과 0.1N NaOH를 적정량 첨가하여 만든 각 pH의 0.1M TRIS/HCl 이나 0.1M TRIS/NaOH buffer 30  $\mu$ l와 규정 농도의 효소용액 15 $\mu$ l를 넣은 후 일정 온도의 항온수조에서 일정시간 반응시킨다. 반응후에 0.1N NaOH 나 0.1N HCl을 적정량 첨가하여 pH를 9.0으로 맞추는 후 UV-spectrophotometer(Shimadzu, Model UV-240)를 사용하여 560nm에서 흡광도를 측정하여 미리 작성한 검량선에 의하여 지방산을 정량하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 효소농도의 변화

리파제가 트리팔미틴의 에스테르 결합을 가수분해하여 팔미트산을 생성할 때 리파제농도의 영향을 알아보기 위하여 트리팔미틴의 농도는 25mM/l, 반응온도 40  $\pm$  0.1 $^{\circ}$ C, 반응시간 2시간, pH를 10.5로 하여 리파제농도를 50, 100, 150, 250mg/l로 변화시켰을 때의 팔미트산의 생성량을 Fig. 1에 나타내었다.

Fig. 1에 의하면, 리파제에 의한 트리팔미틴의 가수분해는 리파제의 농도가 증가하면 생성되는 팔미트산의 양이 전반적으로 증가함을 알 수 있었다. 그러나, 리파제의 농도가 150mg/l 이상에서는 팔미트산의 생성량의 증가가 크지 않았다.

가수분해 효율은 극히 적으나 리파제 농도에 의한 팔미트산의 생성과의 상관성은 충분히 알 수 있었다.

3.2 트리팔미틴 농도의 영향

트리팔미틴의 농도 변화가 리파제의 가수분해에 미치는 영향을 알아 보기 위하여, 반응조건은 반응 온도 40 $^{\circ}$ C, 반응시간 2시간, 반응 pH 10.5에서 리파제의 농도를 100mg/l로 일정하게 하고, 트리팔미

틴의 농도를 5, 15, 25, 50, 75mM/l로 변화시키면서 생성된 팔미트산의 양을 Fig. 2에 나타내었다.

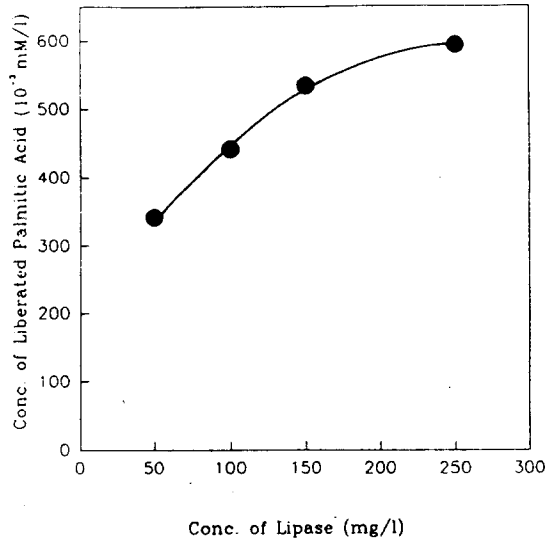


Fig. 1 Effect of lipase concentration on the amount of palmitic acid hydrolyzed from tripalmitin

Conditions: Tripalmitin conc. 25mM/l

Temp. 40  $\pm$  0.1 $^{\circ}$ C

pH 10.5

Reaction time 2 hrs.

Fig. 2에 의하면, 트리팔미틴의 농도가 증가할수록 팔미트산의 생성량이 크게 증가하였는데, 이것은 Tataru 등<sup>43)</sup>의 Mucor-2 리파제에서 얻은 결과와 비슷하다.

3.3 반응시간의 영향

리파제에 의한 트리팔미틴의 가수분해에 미치는 반응시간의 영향을 알아 보기 위하여, 리파제 농도 100mg/l, 반응온도 40 $^{\circ}$ C, 트리팔미틴농도 25mM/l, 반응 pH 10.5에서 반응시간을 0.5, 1, 2, 4, 6으로 변화시키면서 실험한 결과를 Fig. 3에 나타내었다.

Fig. 3에서 알 수 있는 바와같이 반응시간이 증가함에 따라 팔미트산의 생성량이 증가하였다.

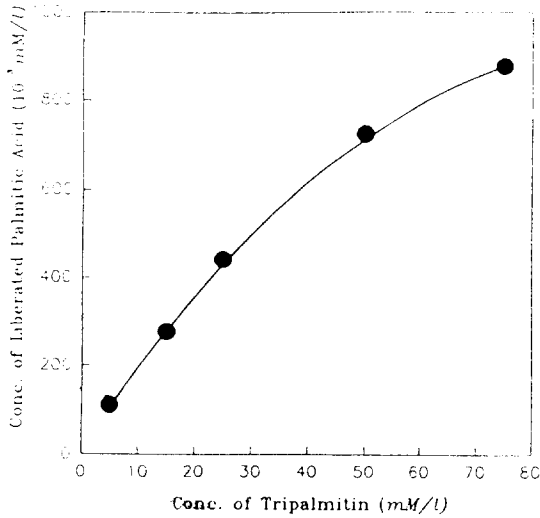


Fig. 2 Effect of tripalmitin concentration on the amount of palmitic acid hydrolyzed from tripalmitin.

Conditions: Lipase conc. 100 mg/l  
 Temp. 40 ± 0.1°C  
 pH 10.5  
 Reaction time 2hrs.

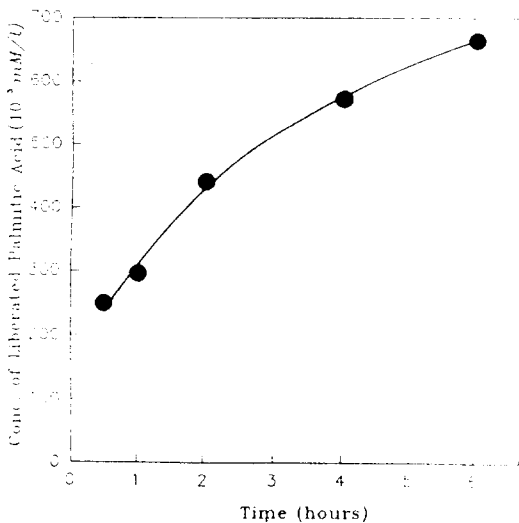


Fig. 3 Effect of reaction time on the amount of palmitic acid hydrolyzed from tripalmitin.

Conditions: Tripalmitin conc. 25mM/l  
 Lipase conc. 100mg/l  
 pH 10.5  
 Temp. 40 ± 0.1°C

3.4 온도의 영향

리파제에 의한 팔미틴의 가수분해에 미치는 온도의 영향을 알아 보기 위하여, 리파제농도를 100mg/l, 반응시간 2시간, 트리팔미틴농도 25mM/l, 반응 pH를 10.5로 하고 온도를 25, 30, 40, 50, 60°C로 변화시키면서, 실험한 결과를 Fig. 4에 나타내었다.

Fig. 4에 의하면, 반응온도가 증가함에 따라 40°C까지는 팔미트산의 생성량이 계속해서 증가하나, 그 이상의 온도에서는 반응온도가 증가함에 따라 팔미트산의 생성량이 감소함을 알 수 있었다. 본 실험에서 사용한 Lipolase 100T도 Umehara 등<sup>12)</sup>이 사용한 Aspergillus oryzae 리파제의 온도특성과 비슷한 결과를 나타냈으며 Lipolase 100T의 최적온도는 40°C임을 알 수 있었다.

3.5 반응액의 pH 의 영향

반응액의 pH변화에 따른 팔미트산의 생성량을 알아 보기 위하여, 트리팔미틴의 농도를 25mM/l, 리파제 농도 100mg/l, 반응시간 2시간, 반응온도 40

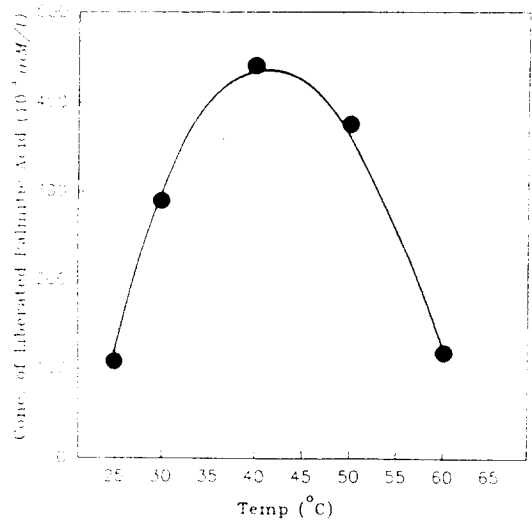


Fig. 4 Effect of temperature on the amount of palmitic acid hydrolyzed from tripalmitin.

Conditions: Tripalmitin conc. 25mM/l  
 Lipase conc. 100mg/l  
 pH 10.5  
 Reaction time 2hrs.

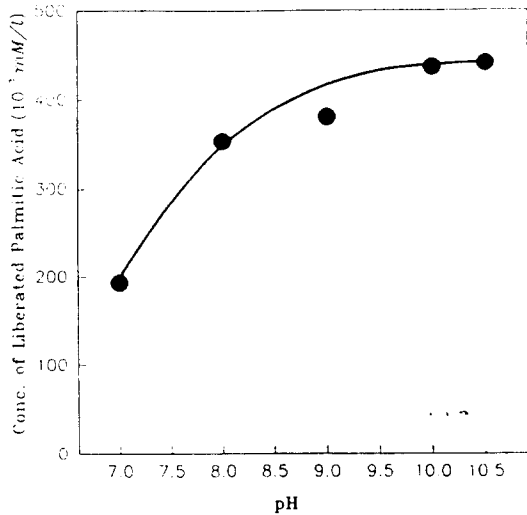


Fig. 5 Effect of pH on the amount of palmitic acid hydrolyzed from tripalmitin.

Conditions: Tripalmitin conc. 25mM/l  
 Lipase conc. 100mg/l  
 pH 10.5  
 Reaction time 2hrs.

℃에서 반응액의 pH를 7, 8, 9, 10, 10.5로 하여, 실험한 결과를 Fig. 5에 나타내었다.

Fig. 5에 의하면, 반응액의 pH가 증가함에 따라 팔미트산의 생성량은 증가하다가 pH 10이상에서는 거의 평형에 도달하였다. 본 실험에서 사용한 리파제가 일반적으로 사용하는 세척조건(pH 10.5~11.0)에서 좋은 활성을 가짐을 알 수 있었다.

#### 4. 결 론

세척과정에서 리파제가 트리팔미틴의 제거에 미치는 효과를 검토하기 위하여, 리파제로는 알칼리 리파제중의 하나인 *Aspergillus oryzae*로 부터 얻은 리파제(Lipolase 100T)를 사용하고, 모델오구로 트리팔미틴, 시험포로 폴리에스테르 직물을 사용하여 리파제에 의한 트리팔미틴의 가수분해효율과 이에 따른 리파제에 의한 트리팔미틴의 세척성에 대해 연구하였다.

리파제에 의한 트리팔미틴의 가수분해조건과 효율은 리파제농도, 트리팔미틴농도, 반응시간, 온도변화

및 반응액의 pH에 따른 팔미트산의 생성량을 W-Idle의 역미셀법으로 검토한 결과 리파제에 의한 트리팔미틴의 가수분해는 최적온도 40℃, 리파제농도 150mg/l, pH 10.5에서 반응시간이 증가할수록 팔미트산의 생성량이 증가함을 알 수 있었다.

#### 참 고 문 헌

1. B. A. Scott, Mechanism of Fatty Soil Removal, *J. Appl. Chem.*, 13, 133(1963)
2. 金聲連, “洗劑와 洗濯의 科學”, 敎文社, 100, (1987)
3. G. W. Cutler and E. Kissa, “Detergency Theory and Technology” : Surfactant Science Series, V. 20, MARCEL DECKKER INC., New York, 8-25, (1987)
4. W. C. Powe, The Nature of Tenaciously Bound Soil on Cotton., *Textile Res. J.*, 29, 879(1959)
5. T. Fort, H. R. Billica and C. K. Sloan, Studies of Soiling and Detergency. Part I : Observations of Naturally Soiled Textile Fibers., *Textile Res. J.*, 36, 7(1966)
6. T. Tsunoda, Analysis of Organic Soils Extracted from Naturally Soiled Clothes., *Bull. Chem. Soc. of Japan*, 41, 475(1968)
7. K. H. Bey, Analysis of Skin Oils from Soiled Clothing., *Am. Perfumer and Cosmetics*, 79, 35 (1964)
8. W. G. Cutler and R. C. Davis, “Detergency Theory and Test Method. Part I” : Surfactant Series, 5, 40-42, MARCEL DECKKER INC., New York, (1972)
9. T. H. Grindstaff, H. T. Patterson and H. R. Billica, Studies of Soiling and Detergency. Part C - Detergency Experiments with Particulate Carbon Soils., *Textile Res. J.*, 37, 564(1967)
10. M. E. Ginn, E. L. Brown and J. C. Harris, Solubilization of Fatty Soils by a Radiotracer Technique., *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 38, 361(1961)
11. W. C. Powe, Removal of Fatty Soils from Cotton in Aqueous Detergent systems., *J. Amer. Oil*

- Chem. Soc.*, **40**, 290(1963)
12. B. E. Gordon, J. Roddewig and W. T. Shebs, A Double Label Radiotracer Approach to Detergency Studies., *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **44**, 289(1967)
  13. T. Fort, H. R. Billica and T. H. Grindstaff, Studies of Soiling and Detergency. Part II – Detergency Experiments with Model Fatty Soil., *Textile Res. J.*, **36**, 99(1966)
  14. M. A. Huisman and M. A. Morris, A Study of the Removal of Synthetic Sebum from Durable Press Fabrics Using a Liquid Scintillation Technique., *Textile Res. J.*, **41**, 657(1971)
  15. R. E. Wagg and C. J. Britt, Detergency Studies Using a Radioactive Tracer., *J. Textile Inst.*, **53**, T205(1962)
  16. H. Machida, Specificity and Origin of Lipases., *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, **33**, 691(1984)
  17. A. R. Macrae, Lipase-Catalyzed Interesterification of Oils and Fats., *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **60**, 291(1983)
  18. S. Okumura, M. Iwai and Y. Tsujisaka, The Effect of Reverse Action on Triglyceride Hydrolysis by Lipase, *Agric. Biol. chem.*, **45**, 185 (1981)