

난황 단백질 가수분해를 위한 효소 고정화 공정 개발

이상욱, 강병철

동의대학교 화학공학과

전화 (051) 890-1924, FAX (051) 890-1619

Abstract

The performance of five supports was evaluated for the immobilization of protease in a packed bed reactor. Celite R640, Duolite A568 and Silicagel 60 showed higher enzyme activity for column operation. The optimum conditions for this operation were pH 5.0 and 50°C. Egg yolk protein was also hydrolyzed to obtain peptide solution in this study.

서론

Protease의 응용은 세제, 가죽 공정, 그리고 식품의약 산업에 집약된다. 산업에 응용하는데 있어 고형담체에 protease를 고정화하는 것은 효소의 재사용을 포함해서, 생산물 분리의 용이성, 효소안정성의 증가, 그리고 충전층반응기에서의 연속반응 등 여러 가지 이점을 제공해주기 때문에 효율적인 효소이용이라는 측면에서 효소의 고정화는 관심이 집중되어 온 한 분야이다.¹⁾ 게다가 식품의약산업에서 고정화된 효소는 이질적인 단백질로부터 목적하는 단백질을 안전하게 할 수 있다. 이 연구는 Orientase 22 BF라는 단백질 가수분해 효소를 이용해서 난황단백질로부터 펩타이드를 생산하는데 있어서의 고정화 최적조건을 알아내기 위하여 이루어졌다.

재료 및 방법

Orientase 22 BF를 가수분해 효소로 사용하였고, 이 효소를 고정화시키는 담체로서 Celite R 640, Dowex - 1, Dowex 50W, Duolite A568, 그리고 Silicagel 60 등의 5가지를 사용하였다.^{2), 3)} 실험은 먼저 flask를 통해서 Casein과 난황박 실험의 최적조건을 결정하고, 고정층반응기를 이용해서 효소고정화의 조건결정 실험을 행하였다. Flask를 통한 casein의 실험에서는 10 g/L를 취해서 그 중 용해성 부분만 남기고 녹지 않는 것은 여과하여 용액부분만 사용하였다. 그리고, 이 중에서 고정화 효율이 좋은 3가지 담체를 선별하여 다시 한번 난황박을 flask 내에서 실험하였으며, 마지막으로 충전층반응기로써 실험하였다. 실험 장치의 개략도는 fig. 1에 나타내었다. 실험은 100시간 동안 하였으며 초기 반응물을 sampling 하고 나서 5시간 간격으로 다시 sampling하여 총 21번의 반응물을 얻었다. 실험 조건은 peristaltic pump를 통한 유량이 30 mL/hr, water jacket을 순환하는 물의 온도는 50°C였다. 아미노산의 분석은 Lowry의 방법에 따랐다.^{4), 5), 6)}

결과 및 고찰

Flask를 이용한 casein solution 실험의 결과로 각 담체별 흡수도는 pH 9.0, 7.0, 그리고 5.0의 경우에 50°C에 대해 fig. 2, 3, 4와 같이 나타났었다. Fig. 2에서 360분 동안의 시간에 가장 흡수도가 뛰어나고 안정적인 것은 Silicagel 60이며, Celite R 640이 다음을 차지하였고, 양

이온교환수지인 Dowex 50W와 음이온교환수지인 Dowex - 1의 경우 상대적으로 낮은 고정화 효율을 보였다. Fig. 3과 4에서는 Celite R 640이 좀 더 나은 고정화 효율을 나타내었으며 마찬가지로 이온교환수지는 낮은 효율을 나타내었다. 이 결과를 토대로 가수분해효소의 고정화가 더 나은 Celite R 640, Duolite A568, 그리고 Silicagel 60 세 가지 담체에 대해 동일 조건하에서 온도를 50℃, 40℃, 30℃로 변화시켜 난황박 실험을 하였다. 이 실험 조건에서는 50℃에서 고정화가 잘 되는 것으로 나타났으며 fig. 5에 그 결과를 나타내었다. 그림에서 보듯이 120분이 넘어서면서부터는 어느 정도 흡수도가 상승하면서 360분까지 고정화된 효소가 활성을 계속 나타낸다. Fig. 6은 고정층반응기를 통한 실험 결과를 그래프로 나타낸 것으로 silicagel 60이 100시간의 기간동안 더 안정적인 반응을 하였다.

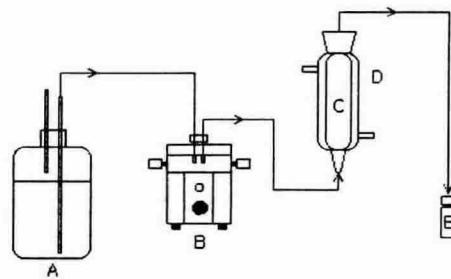


Fig. 1. Schematic diagram of the apparatus. A: Egg Yolk solution reservoir, B: Peristaltic pump, C: Packed bed reactor, D: Water jacket, E: Cryogenic vial.

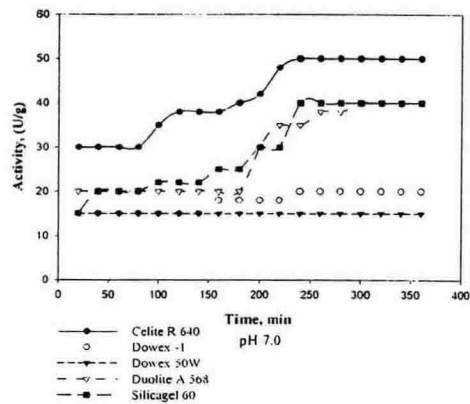
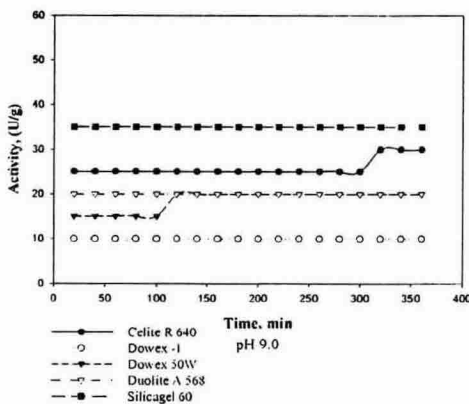


Fig. 2. Activities of each support at pH 9.0 and 50 °C. Fig. 3. Activities of each support at pH 7.0 and 50 °C.

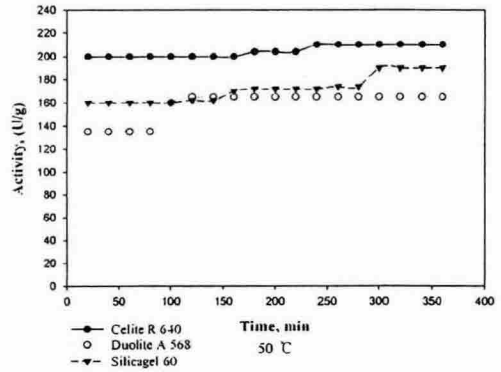
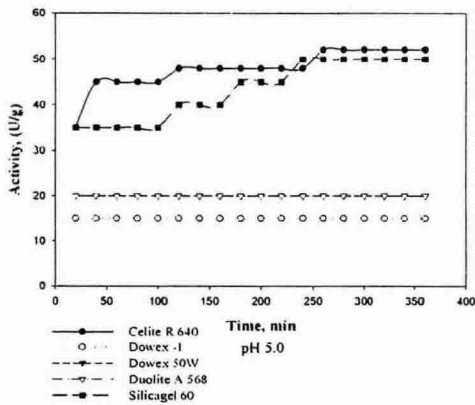


Fig. 4. Activities of each support at pH 5.0 and 50 °C. Fig. 5. Activities of each support at pH 5.0 and 50 °C with egg yolk protein.

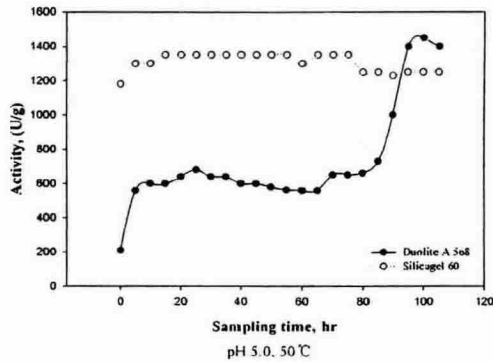


Fig. 6. Activities both Duolite A 568 and Silicagel 60 at pH 5.0, 50 °C

요약

이 연구에서는 가수분해효소인 Orientase 22BF를 5가지 담체에 흡착법을 사용해서 고정시키고 충진층반응기에 넣어 흡수도를 비교함으로써 고정화효율을 평가하였다. 결과는 다음과 같다. 최적 담체는 Celite R 640, Duolite A568, 그리고 Silicagel 60 이었으며, 담체의 최적 조건은 pH 5.0, 온도 50°C로 나타났다. 또한 이 연구에서 peptide solution을 얻기 위하여 난황 단백질을 사용하였다.

참고문헌

1. Mohamed A. Abdel-Naby, A-M. S. Ismail, S. A. Ahned & Ahned F. Abdel Fattah, "Production and immobilization of alkaline protease from *Bacillus mycoides*"(1998), *Bioresource Technology*, 64, 205-210
2. Luigi De Martin, Cynthia Ebert, Gianpiero Garau, Lucia Gardossi, Paolo Linda,

- "Penicillin G amidase in low-water media: immobilisation and control of water activity by means of celite rods"(1999), *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 6, 437-445.
3. Rowaida Graffar, Selim Kermasha, Barbara Bisakowski, "Biocatalysis of immobilized chlorophyllase in a ternary micellar system"(1999), *Journal of Biotechnology*, 75, 45-55.
 4. David Fournand, Frederic Bigey, Robert Ratomahenina, Alain Arnaud, and Pierre Calzy, "Biocatalyst improvement for the production of short-chain hydroxamic acid" (1997), *Enzyme and Microbial Technology*, 20, 424-431.
 5. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., and Randall R. J., "Protein measurement with the folin phenol reagent"(1951), *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
 6. Marie D Jonzo, Abel Hiol, Irene Zagol, Canielle Druet, Louis-Claude Comeau, "Concentrates of DHA form fish oil by selective esterification of cholesterol by immobilized isoforms of lipase from *Candida rugosa*"(2000), *Enzyme and Microbial Technology*, 27, 443-450.