

## 한외여과막 반응기를 이용한 어피젤라틴의 연속적 가수분해

김 세 권 · 변 희 국 · \*M. Cheryan  
부산수산대학교 화학과  
\*일리노이대학교 식품과학과

## Continuous Hydrolysis of Cod Skin Gelatin in an Ultrafiltration Reactor

Se Kwon Kim, Hee Guk Byun and \*Munir Cheryan  
*Department of Chemistry, National Fisheries University of Pusan*  
*\*Department of Food Science, University of Illinois, 1302 W.*  
*Pennsylvania Ave., Urbana, IL 61801, U.S.A*

### ABSTRACT

A continuous stirred tank membrane reactor(CSTMR) was developed and optimized for the production of cod skin gelatin hydrolyzates using endo-protease Alcalase.

A experimental design methodology was used to optimize the four performance variables: enzyme concentration, substrate concentration, permeate flux and reactor volume. All four variables studied had an effect on substrate conversion, with enzyme and substrate concentrations being predominant. Conversion increased with the increase in enzyme concentration, with the decrease in substrate concentration, at high volumes and low flux. A strong interaction was observed between enzyme and substrate concentrations and smaller interactions between enzyme and flux, and substrate and flux. The optimum operating conditions for the CSTMR process for an initial substrate concentration for 10% were 50°C, pH 8, flux 7.3ml/min, residence time 82 min, and Alcalase to substrate ratio 0.02(w/w). A gradual decay in reactor activity during 8 hrs was 2.1% conversion/hr. Enzyme leakage through the 10,000 MWCO membrane was 16% at 50°C and 12% at 35°C, 6hrs. However, there was no apparent correlation between enzyme leakage and substrate conversion. The Km value for the CSTMR was 20 times higher than the batch reactor. The productivity(expressed as mg product/mg enzyme) of the CSTMR was more than six fold higher than the batch at 50°C. The hydrolyzate was non-bitter.

### 서 론

최근 특별한 기능을 갖는 단백질의 수요가 늘어남에 따라 단백질의 기능성을 개량하려는 연구가 활발히 이루어지고 있다(1-6). 이들 중 대표적인 것이 단백질을 단백질 분해효소로 처리한 가수분해물을 환자의 영양강화제와 같은 의약품이나 기능성이 요구되는 식량소재로서 이용하려는 시도이다. 더욱이 우유단백질의 가수분해

물은 향원을 파괴하는데 효과적이라는 것이 밝혀졌다(7-8).

단백질을 산이나 알칼리로 가수분해 할 경우 lysino-alanine과 같은 독성이 있는 부산물이 생성되거나 tryptophan, cysteine 등의 필수아미노산이 손실된다(9). 따라서 단백질의 효소적 가수분해에 관한 연구가 진행되고 있다.

단백질의 효소적 가수분해에 있어서 회분식 공정은

장치가 간단하고 조작이 단순하며 고 농도의 기질을 사용할 수 있지만 많은 양의 효소가 필요하며 높은 에너지와 노동력이 요구된다. 그리고 최종생성물의 지해작용으로 인해 수율이 적고 최종생성물의 기능적인 성질을 조절할 수 없는 단점이 있다(10).

이러한 단점을 해결하기 위해 효소를 물리화학적으로 고정표면에 고정화시켜 단백질을 연속적으로 가수분해시킬 수 있으나 고정화 방법이 까다롭고 고정화시 입체장애로 인한 활성저하(10-90%)가 일어난다(11). 그러나 본 연구에서 시도한 효소반응기와 막장치를 조합시킨 한외여과막 반응기는 효소를 고정화시키지 않고 반복하여 이용할 수 있고 연속적으로 생성물을 분리하여 제품을 생산할 수 있다.

일반적으로 단백질을 효소로 가수분해시킨 가수분해물은 분해과정에서 생긴 저분자 펩티드와 쓴맛을 내는 아미노산 때문에 쓴맛이 강하여 이용상 제약을 받고 있다(12). 젤라틴은 아미노산 조성 중 단맛과 감칠맛을 내는 glycine, proline, hydroxyproline, glutamic acid 등 4종의 아미노산이 전체 아미노산의 약 71%를 차지하고 있다(13).

본 연구에서는 위에 지적인 분해점들을 해결하기 위하여 한외여과막 반응기를 이용하여 대구피에서 추출한 젤라틴을 연속적으로 가수분해하였다. 이때의 회분식과 연속식에 있어서의 젤라틴에 대한 효소의 kinetics를 측정 비교하였으며 한외여과막 반응기 장치에서의 효소활성 및 안정성에 미치는 인자에 대하여 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 재 료

본 실험에 사용한 재료는 삼호물산(주)(부산시 사하구 상림동 소재)에서 구입한 대구피를 이물질(異物質)을 제거하기 위해 차가운 물로 5회 수세한 후 일정크기(100×50×10cm)의 상자에 담아 -60℃에서 동결시킨 다음 세절기로 가로 세로 1cm 정도 크기로 잘라 젤라틴을 열수추출하였다.

젤라틴 추출은 세절한 대구피에 5배량의 물을 가하고 pH 8, 온도 60℃에서 3시간 동안 열수추출한 후 원심분리(10,000×g, 20min) 하였다. 상층액을 황성탄으로 처리한 다음 열풍건조(50℃, 3일간)하여 마쇄한 후 -10℃의 냉상고에 저장하여 두고 실험에 사용하였다.

### 젤라틴의 회분식 가수분해

대구피젤라틴에 대한 각종 단백질 분해효소의 활성을 비교 검토하기 위해 Hsu 등(14)의 pH-drop법을 이용하

였다. 먼저 1%(w/v) 젤라틴 용액 50ml를 만든 다음 0.1N NaOH로 pH 8로 조절한 후 50℃로 예비 가열하였다. 다음에 pH 8로 조절된 증류수로 각각 4.7mg/ml (S/E=21.3, w/w)의 효소용액 5ml를 만들어 기질용액에 가하였다. 이때 감소되는 pH를 pH메타에 연결된 자동기록계로 10분간 연속적으로 측정하였다.

실험에 사용된 효소로는 Alcalase 0.6L(s.g.=1.25, NOVO Co.), Neutrase 0.5L(s.g.=1.25, Novo Co.), chymotrypsin(51 units/mg solid, Sigma Co., No. P-5147), papain(12 units/mg solid, Sigma Co. No. P-4962)였다.

회분식 반응기에서 Alcalase로 젤라틴의 가수분해시  $K_m$ ,  $V_{max}$  측정은 기질농도 0.05%, 0.1%, 0.25%, 1% 및 2%(w/v)인 기질용액 100ml를 반응기에 넣고 50℃로 한 다음 0.1N NaOH로 pH 8로 조절하였다. 반응기 질에 대해 효소용액 0.06mg/ml를 가한 다음 15초 간격으로 2분간 계속 자동피펫으로 가수분해물 3ml를 취하여 20% TCA(trichloroacetic acid) 용액 3ml가 들어 있는 시험관에 넣고 vortex mixer 상에서 1분간 교반한 후 원심분리(1,500×g, 10min) 하였다. 상층액 3ml를 취하여 질소량을 Kjeldahl법으로 측정하였다.

생산량(P) 측정은 반응기에 10%(w/v) 기질용액 600ml를 넣고 50℃로 예비가열하여 4N NaOH로 pH 8로 조절한 다음 0.2mg/ml(w/v) 효소용액을 가하여 10분 간격으로 120분간 kinetic 상수의 측정과 같은 방법으로 질소량을 측정하였으며, 생산량은 Deeslie(15)의 방법에 따라 계산하였다.

$$P(\text{회분식}) = \frac{X \cdot S_0'}{E}$$

$$X(\%) = \frac{P - P_0}{S - S_0} \times 100$$

$$S_0' = \frac{S_0 P_c (1 - P_0)}{f_N}$$

여기서 P : 생산량

X : 전환율(%)

$S_0'$  : 유효기질 농도(mg/ml)

E : 효소 농도(mg/ml)

P : 가수분해물의 TCA 가용분의 전체 질소량

$P_0$  : 가수분해하지 않은 시료의 TCA 가용분의 질소량

$S_0$  : 시료량

$P_c$  : 기질의 단백질 함량(%)

$f_N$  : 젤라틴의 단백질 계수(5.55mg/mgN)

연속식 한외여과막 반응기(Continuous stirred tank membrane reactor, CSTMR)에서 젤라틴의 가수분해 한외여과막 반응기의 전체적인 장치는 Fig. 1에 나타낸

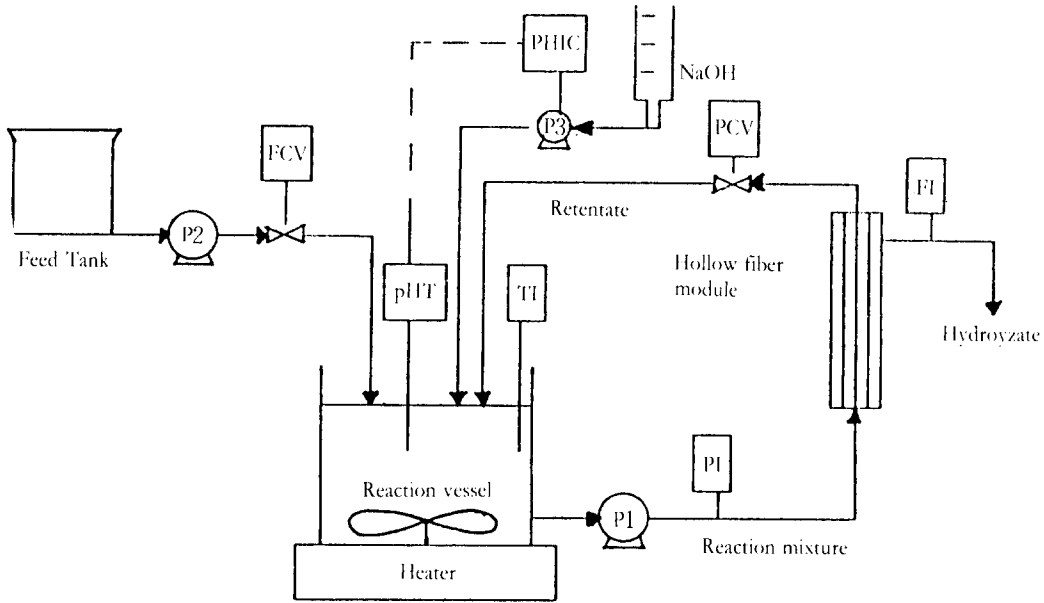


Fig. 1. Continuous stirred tank membrane reactor (CSTMR).

- |                               |                     |                             |
|-------------------------------|---------------------|-----------------------------|
| FCV: Flow control valve       | FI: Flow indicator  | PI: Circulation pump        |
| P2: Substrate pump            | P3: NaOH pump       | PCV: Pressure control valve |
| pHIC: pH indicator controller | pHT: pH transmitter | PI: Pressure indicator      |
| TI: Temperature indicator     |                     |                             |

마와 같이 반응기, 한외여과막, 3개의 펌프(기질공급펌프, 반응혼합물의 순환펌프, pH조절 알칼리 공급펌프), 온도 조절기로 구성되었다.

**기질공급과 반응부피의 조절**

젤라틴용액은 온도 50℃, pH 8로 조절한 다음 기질공급펌프 P<sub>2</sub>(Cole-parmer Instrumental Co.)를 이용하여 가수분해물의 유출속도와 동일한 속도로 반응기에 공급되었다.

반응혼합물의 순환펌프 P1은 Masterflex controller No. 5에 고정시키고 유출속도는 한외여과막 출구에 설치된 압력센트를 사용하여 조절하였으며 유출속도와 동일하게 기질공급펌프를 이용하여 조절하였다.

**pH 조절**

반응혼합물의 pH는 자동pH조절계를 이용하여 pH 8로 고정시켰다. pH가 8 이하로 떨어지면 알칼리 공급펌프 P3가 작동되므로써 4N NaOH가 가해져 pH 8±0.1로 일정하게 유지되도록 조절하였다.

**반응기**

반응기 중의 반응혼합물은 순환펌프 P1을 No. 5에

고정시켜 순환속도가 860ml/min이 되도록 하여 연속적으로 재순환시켰다. 반응혼합물의 온도조절은 열판교반기(Nuova II, stir plate)를 사용하여 50±0.5℃로 조절하였으며 자석막대를 반응기에 넣고 No. 5에 고정시켜 일정하게 교반하였다.

**한외여과막**

한외여과막(A/G Technology Co. Model UFP 10 L-4)은 가수분해물의 분자량이 10,000이하만이 유출되는 10,000 MWCO를 사용하였다.

**유출속도의 조절**

한외여과막을 통한 유출속도는 유양개를 가수분해물의 출구부분에 설치하였다. 유출속도는 메스실린더에 10ml를 모으는데 걸리는 시간을 측정하여 반응혼합물의 순환속도를 일정하게 고정하고 한외여과막을 통해 나오는 출구의 압력센트를 사용하여 조절하였다.

**효소농도**

1% 젤라틴 용액 600ml를 반응기에 각각 넣고 50℃로 가열하여 1N NaOH로 pH 8로 조절하였다. 여기에 효소

농도를 각각 0.02, 0.04, 0.1, 0.2, 0.4 및 1.0mg/ml가 되도록 가한 후 유출속도(J)를 8.0ml/min으로 조절하여 10분간격으로 120분간 2ml씩 취하여 20% TCA용액 2ml에 혼합하여 vortex mixer상에서 1분간 교반한 후 원심분리(1500×g, 10min)한 다음 상층액의 일정량을 취하여 질소량을 측정하여 전환율로 계산하였다.

### 유출속도

1% 젤라틴 용액 600ml를 조제하여 반응기에 넣고 50℃로 가열한 후 1N NaOH로 pH 8로 조절한 다음 0.2mg/ml의 효소를 가하고, 유출속도를 3.75, 7.31, 18.18 및 33.32ml/min로 각각 달리하여 효소농도에서와 같은 방법으로 질소량을 측정하여 전환율로 계산하였다.

### 반응물의 부피

1% 젤라틴 용액 400, 600, 800, 1000ml를 각각 반응기에 넣고 50℃로 가열한 후 pH 8로 조절하였다. 여기에 0.2mg/ml의 효소를 가하여 유출속도를 7.31ml/min로 조절하여 10분간격으로 120분 동안 2ml씩 분취하여 효소농도에서와 같은 방법으로 질소량을 측정하여 전환율로 계산하였다.

### 한외여과막 반응기에서의 반응속도 상수 측정

한외여과막 반응기에서 Alcalase에 의한 젤라틴 가수분해시 반응속도 상수( $K_m$ ,  $V_{max}$ )의 측정은 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 및 6.0%의 젤라틴 용액 600ml를 각각 만들어 반응기에 넣고 50℃, pH 8로 조절하여 0.2mg/ml의 효소를 가하여 반응시켰다.

반응혼합물의 순환속도는 860ml/min로 고정시켜 놓고 유출속도를 7.31ml/min로 조절하였다. 막을 통과한 가수분해물을 10분 간격으로 120분 동안 3ml씩 분취하여 효소농도에서와 같은 방법으로 질소량을 측정하여  $K_m$ ,  $V_{max}$ 를 계산하였다.

### 한외여과막 반응기 장치의 장시간 작동시의 안정성

#### 효소의 안정성에 미치는 온도영향

반응혼합물의 펌핑(pumping)과 재순환에 기인하는 선단효과(shear effects)를 피하기 위하여 회분식으로 50℃와 35℃에서 각각 실시하였다. 즉 회분식 반응기에 증류수 600ml를 넣고 온도와 pH를 조절한 다음 Alcalase 600mg을 가하였다. 반응기로부터 효소액 1ml를 10분간격으로 분취하여 실온에서 1N NaOH로 pH 8로 조절된 1% 젤라틴 현탁액 4ml와 혼합하여 10분 동안 반응시

킨 후 20%(w/v) TCA용액 5ml를 가하여 반응을 종결시켰다. 효소의 활성은 TCA가용분에 존재하는 질소량을 측정하여 나타내었다.

효소의 비활성도(%)=

$$\frac{\text{시간 } t \text{에서의 생성물 농도 } E_t(\text{mgN/ml})}{\text{반응 초기의 생성물 농도 } E_0(\text{mgN/ml})} \times 100$$

### 한외여과막 반응기 장치의 기계적 전단응력에 의한 영향

회분식에서 효소활성의 측정과 같은 방법으로 한외여과막 반응기에 증류수 600ml를 넣고 온도를 일정하게 유지하고 1N NaOH로 pH 8로 조절한 다음 1mg/ml의 효소를 가하여 유출속도 7.31ml/min, 순환속도 860ml/min로 작동하면서 반응기로부터 효소액 1ml를 10분간격으로 분취하여 온도의 영향에서와 같은 방법으로 질소를 측정하였다. 한편, 한외여과막에 의한 효소의 손실을 측정하기 위하여 위와 같은 조건에서 한외여과막을 Tygon tube로 대체하여 효소활성을 측정하였다.

### 한외여과막 반응기에 의한 효소의 누출(leakage)

한외여과막 반응기에서 막을 통한 효소의 누출량을 알아보기 위하여 50℃와 35℃에서 각각 측정하였다. 반응기에 증류수 600ml를 넣고 pH 8로 조절한 다음 1mg/ml의 효소를 가한 후 순환속도 860ml/min, 유출속도 7.31ml/min로 조절하여 막을 통해 누출되는 효소 단백질량을 Lowry법으로 측정하였다. 이때 반응용액의 부피를 일정하게 유지하기 위해 유출속도와 동일한 속도로 pH 8, 온도 50℃로 조절된 증류수를 일정하게 공급하였다.

### 고 기질농도 변화에 따른 전환율의 측정

한외여과막 반응기에서 측정된 각각의 최적조건하에서 기질농도만을 5, 10, 15, 20%로 높여 각 농도에 대한 시간변화에 따른 전환율을 측정하였다. 즉, 각 농도별로 기질용액 600ml를 조제하여 반응기에 넣고 pH 8로 조절하여 각각 S/E=50(w/w)가 되도록 효소를 가한 후 순환속도 860ml/min, 유출속도(J), 7.31ml/min로 조절하여 10분간격으로 120분간 유출되는 가수분해물의 질소량을 측정하여 전환율을 계산하였다.

한외여과막 반응기에서의 생산량 측정: 한외여과막 반응기 장치의 최적조건하에서 젤라틴의 가수분해물 생산량을 측정하였다. 즉, 반응기에 10% 젤라틴 용액 600ml를 넣은 후 50℃, pH 8로 조절한 다음 2mg/ml의 효소를 가한 후 순환속도 860ml/min, 유출속도 7.31ml/min으로 조절하였다. 반응기내의 기질과 효소비가 일정

하게 유지되도록 유출속도와 동일하게 기질공급펌프를 조절하여 10% 젤라틴 용액(50°C, pH 8)을 공급하였다. 이때 한외여과막을 통해 유출되는 가수분해물의 질소량을 측정하여 생산량을 Cheryan과 Deeslie(16)의 방법에 따라 순간 생산량(P<sub>1</sub>) 또는 누적 생산량(P<sub>c</sub>)으로 나타내었다.

$$P_1(\text{mgN} / \text{mgE}) = \frac{\bar{P} \cdot J}{E \cdot V}$$

여기서 P<sub>1</sub>: 순간 생산량(Instantaneous productivity)  
 $\bar{P}$ : 일정시간 t(min)내의 평균생산량(mgN / ml)  
 J: 유출속도(ml / min)  
 V: 반응물의 부피(ml)  
 E: 효소 농도(mg / ml)

$$P_c = \sum P_1$$

P<sub>c</sub>: 시간 변화에 따른 각각 생산량의 합  
 (mgN / mgE)

**결과 및 고찰**

**효소 선정**

단백질의 소화율을 측정하기 위한 *in vitro* "pH-drop"법은 여러가지 단백질 분해효소 중 기질에 대한 활성을 비교하는데 있어서 가장 신속한 방법임을 알 수 있었다. 1% 젤라틴 용액에 대한 papain, Neutrase, chymotrypsin, Alcalase의 젤라틴 분해활성을 비교한 결과는 Fig. 2와 같다. Fig. 2에 나타난 바와 같이 모든 효소들은 반응시간이 길어짐에 따라 pH가 감소하였으며, 특히

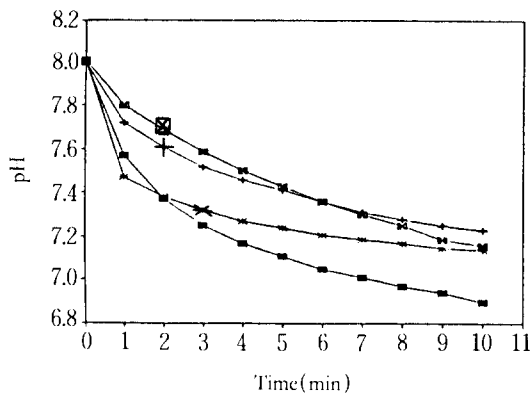


Fig. 2. Comparison of the proteolytic activity of Alcalase [■], Neutrase [+], chymotrypsin [\*] and papain [⊗] on 1% cod skin gelatin (w/v) at 50°C and S/E=21.3(w/w).

Alcalase는 반응시간 8분 이내에 7.0 이하로 떨어져 젤라틴에 대한 활성이 가장 높은 것으로 판단되었다. Mannheim (17)도 1% casein용액에 대해 Neutrase, trypsin, trypsin/chymotrypsin, pronase, chymotrypsin, Alcalase의 활성을 비교한 결과 Alcalase가 가장 우수하였다고 보고한 바 있다.

**회분식 반응기의 Kinetics**

회분식 반응기에서의 기질농도 변화에 따른 효소 활성을 측정하여 Lineweaver-Burk 방법에 따라 plot한 결과는 Fig. 3과 같다. Fig. 3에서와 같이 기질농도 2% 이상에서는 상승곡선을 보여 기질저해가 나타났다. 낮은 기질농도에서 계산된 젤라틴에 대한 K<sub>m</sub> 및 V<sub>max</sub>는 각각 0.377 mgN / ml (0.209%), 0.562mgN / ml / min였다.

Alcalase에 의한 casein의 가수분해에 있어서 Alder-Nissen (18)은 K<sub>m</sub>값이 0.11~0.5% 범위였으며, Mannheim (17)은 0.279%였다고 보고하였다.

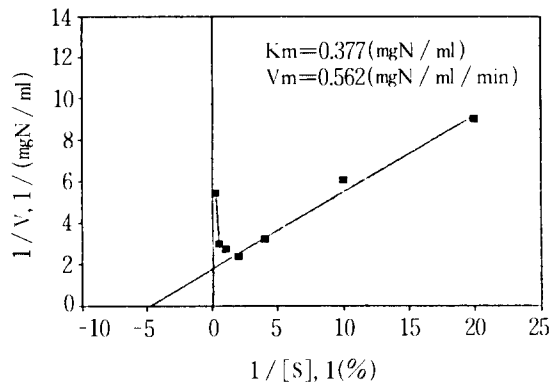


Fig. 3. Lineweaver-Burk plot for Alcalase-cod skin gelatin batch hydrolysis(pH 8, T=50°C, E=0.06mg / ml).

**연속식 반응기에서의 Kinetics**

한외여과막 반응기에서 반응속도 상수를 측정하기 위하여 각 기질농도를 시간변화에 따른 생성량을 측정할 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 기질농도가 높을 수록 정상 상태(steady state)에 도달하는 시간이 길었으며 기질농도 6%일 때는 반응시간이 1시간이 지나 정상상태에 도달되었다. 이들 결과를 Lineweaver-Burk plot 하면 Fig. 5와 같으며, 회분식과 연속식에서의 Michaelis-Menten 상수는 Table 1에 나타내었다.

연속식에서 K<sub>m</sub>값은 회분식에서의 그것보다 20배 정도

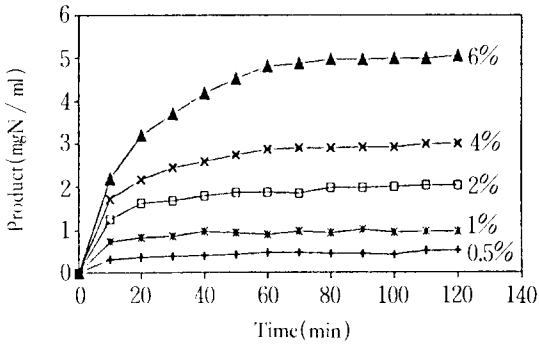


Fig. 4. CSTMR kinetics-effect of substrate concentration on product concentration at various cod skin gelatin concentration (pH 8.0, T=50°C, E=0.2mg/ml, J=7.31ml/min, V=600ml, Q=860ml/min).

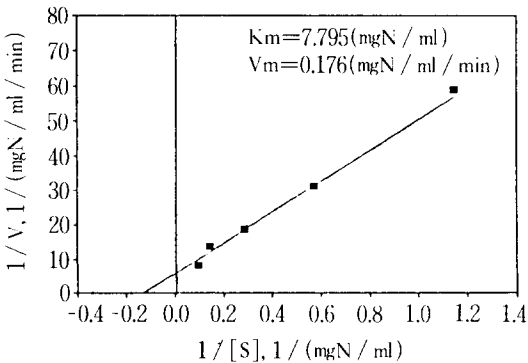


Fig. 5. Lineweaver-Burk plot for Alcalase-cod skin gelatin hydrolysis in a CSTMR (pH 8.0, T=50°C, E=0.2mg/ml, J=7.31ml/min, Q=860ml/min, V=600ml).

Table 1. Summary of kinetic parameters for batch and CSTMR reactors

Kinetic constants	Batch	CSTMR
$K_m$ (mgN/ml)	0.377	7.795
(%)	(0.209)	(4.326)
$V_{max}$ (mgN/ml/min)	0.562	0.176
$*K_2$ (min <sup>-1</sup> )	58.542	5.500
$V_{max}/K_m$ (min <sup>-1</sup> )	1.490	0.023
$R^2$	0.960	0.980

\* $K_2 = V_{max} / E$ (min<sup>-1</sup>)

큰 반면,  $V_{max}$ ,  $K_2$ 는 매우 작았다. 이와같이 연속식에서 효소와 기질의 친화력이 낮은 것은 효소의 일부가 누출되었거나 효소의 막표면에 흡착으로 인한 활성저하, 반응 혼합물의 높은 순환속도에 의한 전단응력(shear rate)등 여러 인자에 기인되는 것으로 판단된다.

연속식에서  $V_{max}$ 와  $K_2$ 값은 회분식에서 보다 각각 3배, 10배 정도 낮았는데 그 이유는 위에서 설명한 원인들에 의해 한외여과막 반응기에서 Alcalase의 활성이 감소됨을 알 수 있었다.

$K_m$ 값은 각 반응기 형태에 대해 최적 기질 농도의 추정에 이용될 수 있다.  $K_m$ 보다 낮은 기질농도는 반응속도를  $V_{max}$ 보다 훨씬 낮기 때문에 대부분의 catalytic potential을 잃게 되는 반면,  $K_m$ 보다 높은 기질농도에서는 product stream에서 고형물량의 증가와 더불어 downstream processing cost를 낮출 수 있을 것으로 본다.

$V_{max}/K_m$ 비도 기질에 대한 효소의 친화도의 지표가 될 수 있다. 즉, 이 비가 클수록 기질과 효소의 친화도는 크게 된다. 회분식에서  $V_{max}/K_m$ 비는 한외여과막 반응기에서 계산된 값보다 6.5배 높았다.

한외여과막 반응기에서의 가수분해 최적조건

효소 농도

정상상태에서의 한외여과막 반응기에서 효소농도 변화에 따른 기질의 전환율을 측정한 결과는 Fig. 6과 같다. 효소농도가 0.2mg/ml까지는 전환율이 급격히 증가되다가 0.4mg/ml 이상에서는 전환율이 86%로 거의 일정하였다. 본 실험에서는 효소농도가 0.2mg/ml와 0.4mg/ml

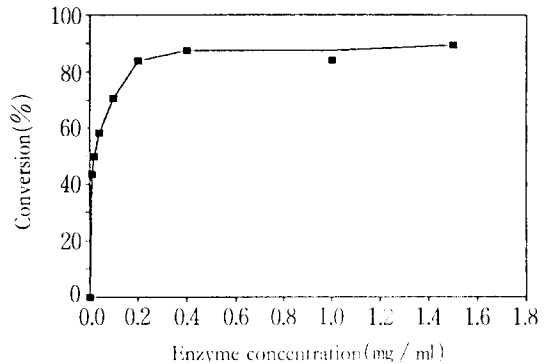


Fig. 6. Effect of enzyme concentration on conversion in CSTMR, Alcalase-cod skin gelatin (pH 8.0, T=50°C,  $S_0=1\%$ (w/v), J=7.31ml/min, V=600ml).

사이에서 전환율은 큰 차이가 없었으므로 최적효소농도는 0.2mg/ml로 하였다.

**기질 농도**

정상상태에서의 한외여과막 반응기에서 기질농도 변화에 따른 전환율을 측정된 결과는 Fig. 7과 같다. Fig. 7과 같이 기질농도 1% 이하에서는 82% 이상의 전환율을 나타내었으나 기질농도가 증가함에 따라 다소 전환율이 감소하는 경향을 보였다. 또한, 기질농도가 낮을수록 정상상태에 도달되는 시간은 짧았으며 생산성은 오히려

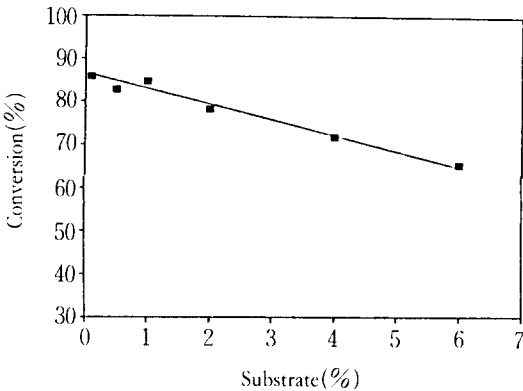


Fig. 7. Effect of substrate concentration on conversion in CSTMR, Alcalase-cod skin gelatin. (pH 8.0, T=50°C, E=0.2mg/ml, V=600ml).

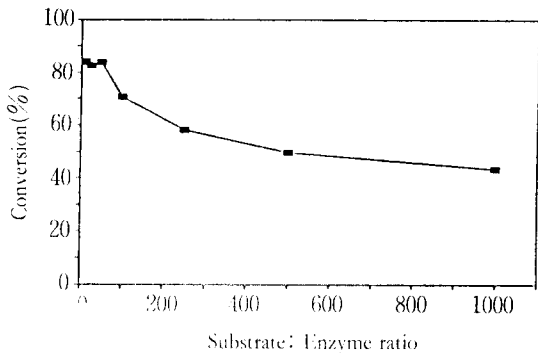


Fig. 8. Effect of substrate to enzyme ratio(w/w) on conversion in CSTMR, Alcalase-cod skin gelatin. (pH 8.0, T=50°C, J=7.31ml/min, V=600ml).

낮아지는 경향을 보였다. 회분식 반응기에서 관찰되었던 기질저해가 한외여과막 반응기에서는 정상상태하에서 기질농도 6%에서도 나타나지 않았다. 이같은 결과는 회분식 반응기에서는 생성물이 기질과 공존하지만 한외여과막 반응기에서는 생성물이 제거되기 때문인 것으로 생각된다. Deeslic(15)는 대두단백질을 pronase로 연속적 가수분해시 최적 E:S비는 1:9와 1:16 사이였다고 보고한 바 있다. 기질대 효소비는 Fig. 8에 나타난 바와 같이 S/E=50(w/w) 이하에서는 거의 83% 이상의 전환율을 보였으며 S/E가 클수록 전환율은 약간 감소하는 경향을 나타내었다.

**유출 속도**

정상상태에서 유출속도 변화에 따른 기질의 전환율을 측정된 결과는 Fig. 9와 같다. 유출속도가 낮을수록 반응기내에서 효소와 기질이 반응하는 시간이 길어지기 때문에 전환율은 높으며 유출속도가 클수록 그 반대 경향을 나타내었다. 본 실험에서는 유출속도를 전환율이 85%인 7.31ml/min으로 정하였다.

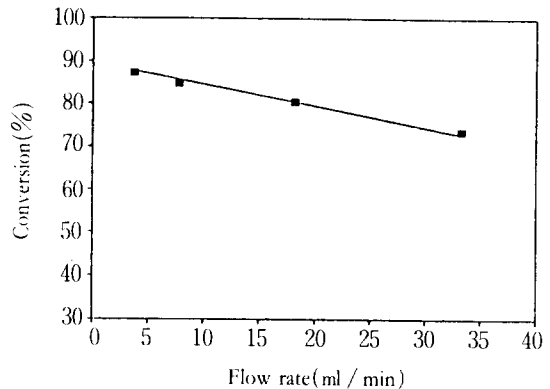


Fig. 9. Effect of flow rate on conversion in CSTMR, Alcalase-cod skin gelatin. (pH 8.0, T=50°C, So=1%(w/v), E=0.2mg/ml, V=600ml).

한외여과막 반응기 system에서 반응기는 1l vessel을 사용하였으며, 정상상태하에서 반응기의 반응혼합물의 부피변화에 따른 전환율을 측정된 결과는 Fig. 10과 같다. 반응혼합물의 부피가 400ml 이하에서는 기계적 장치의 제한으로 재순환이 불가능하였으며 부피가 600ml 이상에서는 전환율이 86%로 거의 일정하였다.

잔류시간은 기질용액이 반응기로 공급된 후 효소와 반응하여 가수분해물로 분해되어 유출될 때까지의 시간

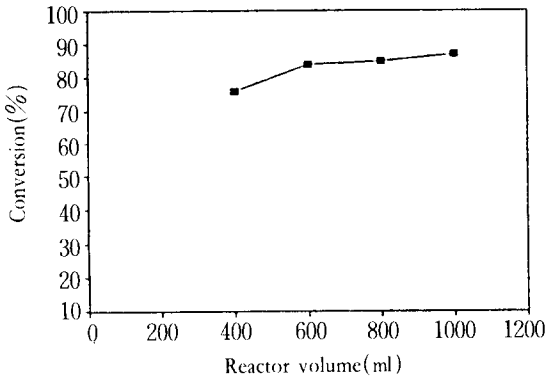


Fig. 10. Effect of reactor volume on conversion in CSTMR, Alcalase-cod skin gelatin (pH 8.0,  $T=50^{\circ}\text{C}$ ,  $S_0=1\%$  (w/v),  $E=0.2\text{mg/ml}$ ,  $J=7.31\text{ml/min}$ ).

을 말한다. 정상상태하에서 반응기내의 효소와 기질이 반응할 수 있는 잔류시간 변화에 따른 전환율을 Fig. 11에 나타내었다. 잔류시간 82분까지는 전환율이 증가되었으나 그 이후는 큰 차이가 없었다. 유출속도가  $7.31\text{ml/min}$ 에서 잔류시간 82분이었으며 이때의 기질 전환율은 85%였다. Deeslie(15)는 대두단백질의 연속적 가수분해시 최적잔류시간은 180분이었으며 잔류시간이 그 이상일 때는 경제적인 관점에서 실용적이지 못하다고 보고하였다.

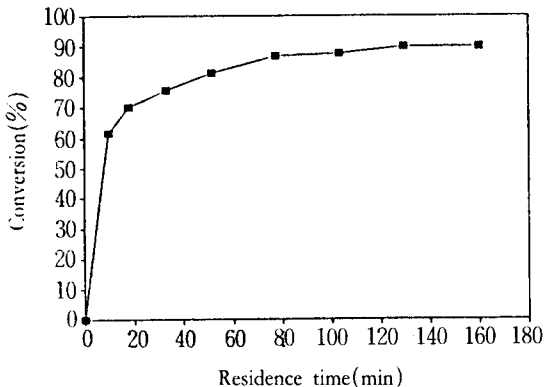


Fig. 11. Effect of residence time conversion in CSTMR, Alcalase-cod skin gelatin. (pH 8.0,  $T=50^{\circ}\text{C}$ ,  $S=1\%$  (w/v),  $E=0.2\text{mg/ml}$ ).

#### 한외여과막 반응기 system의 장시간 작동시 안정성

반응장치의 장시간 작동시의 안정성을 측정하기 위하여 기질 10%,  $E=2\text{mg/ml}$ ,  $J=7.31\text{ml/min}$ ,  $Q=82.08\text{min}$ , 반응온도  $50^{\circ}\text{C}$  및  $35^{\circ}\text{C}$ 의 조건하에서 시간변화에 따른 기질의 전환율을 측정한 결과는 Fig. 12와 같다. 반응시간이 1시간 부근에서 최대전환율을 나타내었으며, 그 이후 반응시간이 길어질수록 전환율은 다소 떨어지는 경향을 나타내었다. 8시간 작동시켰을 때의 기질의 전환율은 69%였으며 이것은 시간당 평균전환율의 감소로는 21%였다.  $50^{\circ}\text{C}$ 에 비해  $35^{\circ}\text{C}$ 에서 전환율이 낮은 것은 Alcalase의 최적온도가  $50^{\circ}\text{C}$ 이기 때문이라 생각된다.

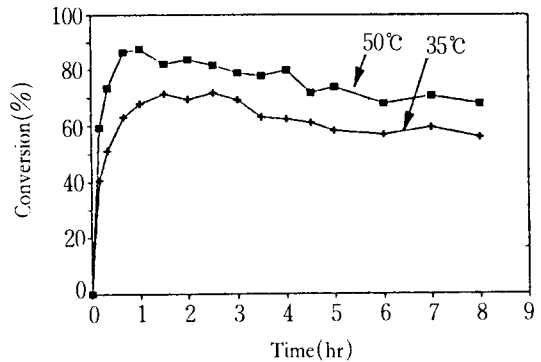


Fig. 12. Long-term operating stability of CSTMR for Alcalase-cod skin gelatin hydrolysis. (CSTMR conditions:  $S=10\%$ ,  $E=2\text{mg/ml}$ ,  $J=7.31\text{ml/min}$ ,  $\theta=82.08\text{min}$ ).

이와 같이 장시간 작동시켰을 때의 전환율을 떨어뜨리는 인자로서 ① 효소누출, ② 열에 의한 효소의 불활성화, ③ 막과 접촉으로 인한 효소의 흡착 또는 독성, ④ 기계적 응력, ⑤ 생성물에 의한 저해 또는 분해되지 않은 기질의 축적 등을 들 수 있다(19).

이들 인자가 CSTMR의 장시간 작동시 안정성에 미치는 영향을 검토하였다.

#### 효소의 누출(Enzyme leakage)

한외여과막을 통한 효소의 누출에 대한 온도효과와 반응시간 변화에 따른 효소누출량을 측정한 결과를 Fig. 13에 나타내었다. 반응시간 10~60분 범위에서 효소누출량이 최대였으며 4시간까지는 서서히 감소되다가 6시간 이후에는 거의 누출되지 않았다. 전체 효소량중 효소누출량은  $50^{\circ}\text{C}$ 에서 16%인데 비해  $35^{\circ}\text{C}$ 에서는 12%였다. Mannheim(17)은 membrane reactor를 이용하여 Alcalase



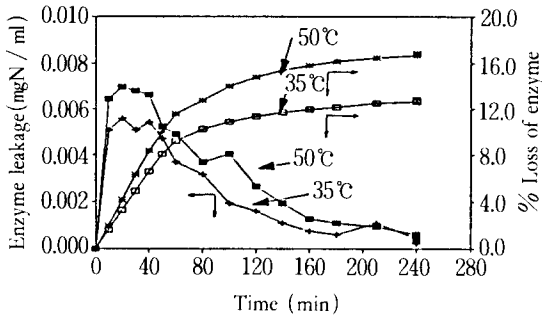


Fig. 13. Leakage of enzyme in the CSTMR at 50°C and 35°C. (pH 8.0, E=2mg/ml, J=7.31ml/min, V=600ml, Q=860ml/min)

로 casein을 가수분해시 효소의 누출량을 측정 한 결과 50°C와 37°C에서 각각 57%와 52%였으며 반응기 조작 90분 이내에 누출시료에서만 단백질 분해활성을 측정할 수 있었다고 보고한 바 있다. Fig. 12에 나타난 결과와 비교해 볼 때 효소누출과 반응기 안정성간에는 직접적인 상호관계는 나타나지 않았다. 이 결과로 보아 초기단계에서 누출된 효소는 잔류효소의 활성에 크게 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다.

한외여과막 및 기계적 전단응력에 의한 영향

수용액중에서 Alcalase의 활성에 대한 한외여과막의 영향을 알아보기 위해 초기활성을 측정 한 결과는 Fig. 14와 같다. 열에 의한 Alcalase의 불활성화를 최소화 하기 위해 한외여과막 반응기장치를 실온(20°C)에서 작동시켰으며 CSTMR에서 한외여과막을 Tygon tube로 대체시킨

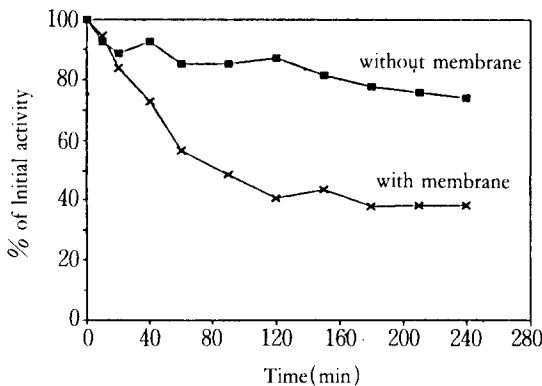


Fig. 14. Effects of membrane poisoning and mechanical shear on Alcalase activity.

장치(CSTR)를 대조구로서 사용하였다. CSTMR은 작동시간이 120분까지 Alcalase 활성에 크게 영향을 미쳤으며 120분 이상에서는 거의 활성저하가 나타나지 않았다. 작동시간 120분에서 초기속도의 56%가 저하되었다. 그러나 CSTR에서는 Alcalase의 활성이 반응시간이 길어짐에 따라 서서히 감소되었으며, 반응시간 240분에서 24%의 활성저하를 나타내었다. 한외여과막(polysulfone)은 Alcalase를 흡착하거나 활성 부위에 영향을 미치는 것으로 판단된다. 효소 활성에 대한 polysulfone의 영향에 대하여 cheryan의 보고가 있다(20).

사용기질 농도의 한계

CSTMR에서 최적분해 조건인 pH 8, 온도 50°C, 유출 속도 7.31mg/ml, 부피 600ml, S/E, 50w/w에서 기질농도만을 5%, 10%, 15%, 20%로 높여 전환율을 측정 한 결과는 Fig. 15와 같다. 기질농도가 5% 및 10%에서는 반응시간 40분 이후에 전환율이 약 83%였으나 15% 및 20%에서는 전환율이 약 70%정도였다. 기질농도가 25% 이상에서는 압력부하로 인하여 측정할 수 없었다. 따라서 본 실험장치에서의 기질농도는 10%가 적합한 것으로 판단되었다. 일반적으로 효소에 의한 단백질의 가수분해시 기질농도는 1%~5% 범위로 보고(11, 21, 22)되어 있으므로 본 연구에서의 기질농도 10%는 매우 높은 기질농도임을 알 수 있다.

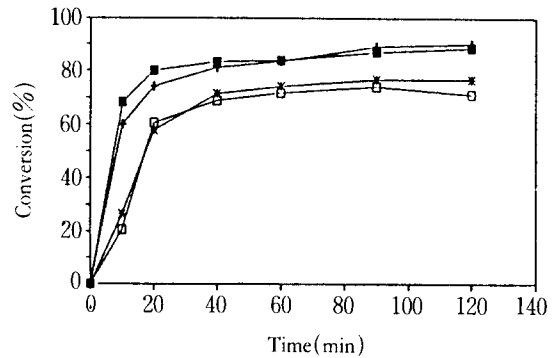


Fig. 15. Comparison of the conversion of CSTMR with substrate concentration 5%[■], 10% [+], 15%[\*], 20%[□] at 50°C, pH 8.0. (CSTMR conditions: S/E=50(w/w), (J=7.31ml/min, V=600ml).

생산량

최적분해 공정조건하에서 회분식과 연속식에서의 부피

대체율에 대한 생산량을 Fig. 16에 나타내었다. 연속식에서는 작동 6시간 동안 부피대체율에 대한 생산량이 거의 비례적으로 증가하였지만 그 이후는 다소 생산량이 감소되는 경향을 나타내었다.

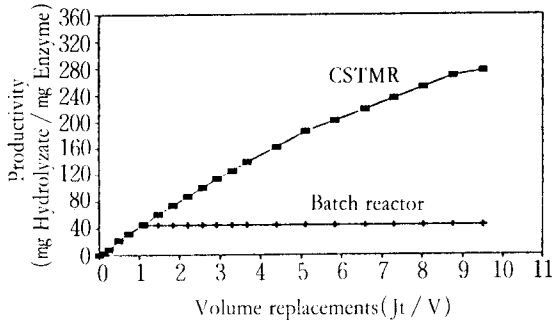


Fig. 16. Comparison of the productivity of CSTMR with the batch reactor at 50°C and pH 8.0 (CSTMR conditions:  $S_0=10\%$ ,  $E=2\text{mg/ml}$ ,  $J=7.31\text{ml/min}$ ,  $V=600\text{ml}$ ,  $S/E=50(w/w)$ ).

이와 같이 부피대체율이 증가됨에 따라 생산량이 다소 감소되는 것은 반응기내에서의 효소의 활성저하에 기인되는 것으로 생각된다. 이 문제는 효소를 반응기내에 주기적으로 가하여 주므로써 해결할 수 있다고 본다.

회분식과 연속식에서의 생산량의 차이점은 회분식 반응기에서의 생산량이 부피변화에 무관하며 회분식의 경우 정상 상태에서의 생산량은 효소 mg당 가수분해물이 44.8mg였으나, 연속식에서는 효소 mg당 가수분해물이 285mg으로 회분식에 비해 6배 이상의 생산량을 나타내었다. 회분식에서는 각각 부피변화에 대한 같은 양의 효소와 기질이 필요하다. 기질에 대한 효소의 친화도는 연속에서 낮았지만 반응물의 재순환에 의한 효소의 사용으로 인하여 효소당 생산량은 회분식에 비해 월등히 높았다.

## 요 약

효소를 이용하여 대구피 젤라틴 가수분해물을 연속적으로 생산하기 위해 한외여과막 반응기에서의 젤라틴 가수분해 최적 공정조건 및 한외여과막 반응기를 장시간 작동하였을 때의 효소활성 저하원인을 구명하였다. 효소 농도가 0.4mg/ml까지 증가함에 따라 기질의 전환율은 증가하였으나 기질의 경우는 농도가 증가함에 따라 전환율이 감소하였다. 유량(Flux)이 클수록 전환율은 감소되었으며 잔류시간이 길 수록 전환율은 증가하였다. 한외여

과막 반응기 장치의 작동시 기질의 전환율은 반응시간 1시간 부근에서 최대 전환율을 나타내었으며 시간당(8시간 작동) 평균 전환율 감소는 2.1%였다. 한외여과막을 통한 효소 누출은 반응시간 10~60분 범위에서 최대였으며 6시간 이후에는 거의 누출되지 않았다. 전체 효소량 중 누출량은 50°C에서 16%인데 비해 35°C에서는 12%였다. 그러나 효소 누출과 기질 전환율 사이에 명백한 상호관계는 나타나지 않았다. 막에 의한 효소의 활성저하는 작동시간 120분까지 나타났으며, 이때 초기속도의 36%가 저하하였다. 연속식(CSTMR)에서  $K_m$  값은 회분식의 그것보다 20배 큰 반면  $K_2$  값은 10.5배 낮았다. 최적 가수분해조건은(기질농도 10%, 50°C, pH 8.0, 유량 7.31ml/min, 잔류시간 82분, S/E=50w/w) 하에서의 생산량은 효소 mg당 가수분해물이 285mg으로 회분식의 44.8mg에 비해 6배 이상이었다.

## 감 사

본 연구는 1990년도 산학협동재단의 학술연구비 지원으로 수행되었으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

1. J. R. Whitaker(1977), *Food protein: Improvement Through Chemical and Enzymatic Modification*, R. E. Feeney and J. R. Whitaker(Ed), p.95, Adv. in Chem. Series 160, American Chemical Soc., Washington, D.C.
2. J. E. Kinsella and D. M. Whitehead(1987), *Milk-The Vital Force*, p.791, D. Reidel publishing company, Dordrecht, Holland.
3. G. B. Quaglia and E. Orban(1987), *J. Sci., Food Agric.*, **38**, 263.
4. 김세권, 광동채, 조덕제, 이응호(1988), *한국영양식량학회지*, **17**, 233.
5. 김세권, 광동채, 조덕제, 이응호(1988), *한국영양식량학회지*, **17**, 242.
6. 김세권, 광동채, 조덕제, 이응호(1988), *한국영양식량학회지*, **17**, 312.
7. H. Otani, K. Takayama and F. Tokita(1985), *Milch-wissenschaft*, **41**, 565.
8. R. Jost, J. C. Monti and J. J. Pahud(1987), *Food Technol*, **41**, 118.
9. J. E. Kinsella(1979), *A Survey CRC Critical Rev. Food Sci. Nutr.*, **7**, 219.
10. W. D. Deeslie and M. Cheryan(1981), *J. Food Sci.*,

- 46, 1035.
11. A. Mannheim(1988), *Master's Thesis, Dept. of Food Sci.*, Univ. of Illinois, Urbana-Champaign.
  12. 김세권, 이응호(1987), *한국수산학회지*, **20**, 282.
  13. 김세권, 이응호, 강옥주, 권철성(1986), *냉조공조공학*, **5**, 5.
  14. H. W. Hsu, D. L. Vavak, L. D. Satterlee and G. A. Miller(1977), *J. Food Sci.*, **42**, 1269.
  15. W. D. Deeslie(1980), *Ph. D. Thesis, Dept. of Food Sci.*, University of Illinois, Urbana-Champaign.
  16. M. Cheryan and W. D. Deeslie(1983), *J. Am. Oil Chemists'Soc.*, **60**, 1112.
  17. A. Mannheim(1989), *Master's Thesis, Dept. of Food Sci.* University of Illinois, Urbana-Champaign.
  18. J. Alder-Nissen(1986), *Enzymic Hydrolysis of Food Proteins.*, p.172, Elsevier Applied Sci. Pub., Amsterdam, Holland.
  19. T. Finocchairo, N. F. Olson and T. Richardson(1980), *Advance in Biochemical Engineering*, **15**, p.71., Ed., Ficchter, A. Springer-Verlag, N. Y.
  20. M. Cheryan and M. A. Mehaia(1986), *Membrane Separation in Biotechnology* McGregor, C. W.(Ed.), p.225, Marcel Dekker, Inc., N. Y.
  21. R. Julien(1988), *Biotechnol. Bioeng.*, **31**, 650.
  22. S. Bhumiratana, C. G. Hill JR. and C. H. Amundson (1977), *J. Food Sci.*, **42**, 1016.
- (Received; October 7, Revised; October 20  
Accepted; October 30)**