

## 2단계 막반응기를 이용한 어피젤라틴 가수분해물의 연속적 생산

김세권\* · 변희국 · 전유진 · 양현필 · 조덕제<sup>1</sup>

부산수산대학교 화학과

<sup>1</sup>동서공과대학 식품공학과

**초록** : 연속식 2단계 막(MWCO 10,000, MWCO 5,000)반응기를 이용하여 어피젤라틴 가수분해물 제조를 위한 최적 가수분해조건과 막반응기 장치에서 효소활성, 효소안정성에 미치는 인자 및 가수분해물의 생성량에 대하여 검토하였다. pH-drop법으로 젤라틴 분해에 대한 효소활성은 pronase E가 가장 높았고, 다음이 trypsin이었다. 1단계 막반응기에서 trypsin으로 어피젤라틴의 최적 가수분해조건은 반응온도 55°C, pH 9.0, 효소농도 0.1 mg/ml, 기질 대 효소비 100(w/w), 반응부피 600 ml, 유출속도 6.14 ml/min였으며, 이때 가수분해도는 79%였다. 2단계에서 1단계 젤라틴 가수분해물을 pronase E로 분해할 경우는 반응온도 50°C, pH 8.0, 효소농도 0.3 mg/ml, 기질 대 효소비 33(w/w)였으며 그 이외의 조건은 1단계와 동일하였고, 이때의 가수분해도는 80% 이상이었다. 막을 통한 효소의 누출량은 1단계에서 전체 효소량 중 작동시간 5시간에서 11.5%였으나 5시간 이후에는 거의 누출되지 않았으며, 2단계에서는 작동시간 4시간에서 9.0%가 누출되었다. 막반응기의 기계적인 전단응력에 의한 효소활성 저해는 1단계 및 2단계에서는 작동시간 3시간까지 34% 및 18%가 각각 감소되었으며, 이때 막을 제거시킨 반응기에서 효소활성 감소는 23% 및 10%가 각각 저해되었다. 그러나 효소 누출과 가수분해물의 생산량 사이에는 명백한 상호작용은 나타나지 않았다. 1단계 및 2단계 막반응기의 각 최적조건하에서 부피대체율 8배까지의 가수분해물의 생산량은 각각 334 mg 및 250 mg으로 2단계 보다 1단계의 효소 mg당 생산량이 약 1.3배 높았다(1994년 2월 21일 접수, 1994년 4월 22일 수리).

### 서 론

최근 특별한 기능을 갖는 단백질의 수요가 늘어남에 따라 단백질의 기능성을 개선하려는 연구가 활발히 이루어지고 있다.<sup>1,2)</sup> 이들 중 대표적인 것이 단백질을 가수분해효소로 처리한 가수분해물을 환자의 영양강화제와 같은 의약품이나 기능성이 요구되는 식량소재로서 이용하려는 시도이다. 특히 최근에는 단백질 가수분해물의 생리적 기능들이 밝혀지고 있다.<sup>3)</sup>

단백질을 산이나 알칼리로 분해할 때 여러가지 문제가 야기되는데 산으로 가수분해 할 경우 tryptophan과 같은 펩수아미노산과 cysteine이 분해 소실되며,<sup>4)</sup> 알칼리로 분해할 경우는 lysinoalanine[N-DL-(amino-2-carboxyethyl)-L-lysine]과 같은 독성물질이 생성되어 안전성 문

제가 대두되고 있다.<sup>5)</sup>

근년 들어 고정화 효소를 이용한 단백질의 연속적 가수분해에 관한 연구가 이루어지고 있으나<sup>6-9)</sup> 고정화 방법이 까다롭고 고정화하는데 입체장애에 의한 활성저하(10%~90%)가 일어난다.<sup>10)</sup> 그러나 본 연구에서 효소 반응기와 막장치를 조합시킨 막 반응기는 효소를 고정화시키지 않고 반복하여 이용할 수 있고 연속적으로 생성물을 분자량별로 분리하여 제품을 생산할 수 있다.

젤라틴의 가수분해에 관한 연구로는 Sattler 등<sup>11)</sup>은 소와 돼지피의 가수분해물이 meat emulsions에서 binder로서 이용될 수 있다고 하였고, Monsheimer와 Pfeleiderer<sup>12)</sup>는 피혁폐기물을 미생물 protease로 가수분해를 시도하였으며, Appleman<sup>13)</sup>은 카제인 가수분해물과 젤라틴 가수분해물을 혼합하여 관능적으로나 영양적으로 우

Key words : Two-stage membrane reactor, enzymatic hydrolysis, fish skin gelatin, continuous production

\*Corresponding author : S.-K. Kim

수한 음료를 만들 수 있었다고 보고하였다. 한편 효소를 이용하여 젤라틴과 다른 단백질을 동시에 가수분해시켰을 때 맛이 좋아졌다는 여러 보고가 있다.<sup>14-16)</sup>

본 연구는 우리나라 수산가공공장에서 부산물로 얻어지는 어피는 연간 약 30만톤이며 이들은 일부 사료 또는 비료로 이용되거나 아니면 대부분 폐기되어 환경오염을 야기시키고 있으므로 이를 보다 효율적으로 이용하기 위한 일련의 연구로서 가자미피 젤라틴을 연속식 2단계 막반응기를 이용하여 1단계 및 2단계 막반응기에서 단백질을 가수분해효소를 각 단계별로 달리하여 연속적으로 가수분해하였다. 이때 회분식, 1단계 및 2단계 연속식 막반응기에 있어서 각 효소의 kinetics를 측정 비교하였으며, 각 연속식 막반응기 장치에서 효소의 활성 및 안정성에 미치는 인자와 젤라틴 가수분해물의 생산량을 높이기 위한 최적화 공정을 확립하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

강 등<sup>17)</sup>의 방법에 따라 가자미(*Limanda aspera*) 껍질로부터 젤라틴을 제조하여  $-10^{\circ}\text{C}$ 의 냉장고에 저장하여 두고 가수분해 시료로 사용하였다.

### 방법

#### 1) 가수분해 효소의 선별

가자미피 젤라틴에 대한 각종 단백질 분해효소의 활성을 비교 검토하기 위해 Hsu 등<sup>18)</sup>의 pH-drop법을 이용하였다. 1%(w/v) 가자미피 젤라틴 용액 50 ml/씩을 각 효소의 최적 활성을 나타내는 pH 및 온도로 조절한 다음, 여기에 효소용액 5 ml/(4.7 mg/ml, S/E=21.3, w/w)를 만들어 기질용액에 가한 순간부터 효소작용으로 인하여 감소되는 pH를 pH자동기록계로 10분간 연속적으로 측정하였다.

1단계 및 2단계 막반응기의 효소의 선정에 사용된 효소는 Alcalase 0.6L(s.g.=1.25, NOVO Ind., Copenhagen/Denmark Batch No.PMN 0046, 90-9), chymotrypsin (51 units/mg solid, Sigma Co., No. P-5147), trypsin(10,000 BAEE units/mg solid, Sigma Co., No. T-8003), papain(12 units/mg solid, Sigma Co. No. P-4962), pronase E(4.4 units/mg solid, Sigma Co., N0. P-5147)였다.

### 연속식 2단계 막반응기를 이용한 젤라틴의 가수분해

#### 1) 연속식 2단계 막반응기 장치

연속식 2단계 막반응기 장치는 Fig. 1에서와 같이 기질 공급장치, 1단계 막반응기 장치(1st-step continuous membrane reactor, 1st-SCMR) 및 2단계 막반응기 장치(2nd-step continuous membrane reactor, 2nd-SCMR)로 크게 구분할 수 있다. 기질공급장치 외에 각각의 막반응기는 반응기, 한외여과막, 열판교반기(NuovaII, stir plate), pH 자동조절기(Cole-parmer Instrumental Co., Model 5652-20), 유량계, 압력조절밸브 및 2개의 펌프(순환펌프, 알칼리 공급펌프)로 구성되어 있다. 이들 장치들을 효율적으로 작동하기 위하여 다음과 같이 1단계 및 2단계 막반응기의 작동조건을 측정하였다.

### 연속식 2단계 막반응기의 작동조건 측정

#### 1) pH 및 온도조절

1단계 및 2단계 막반응기에서 pH와 온도는 pH-drop법으로 선정된 trypsin 및 pronase E의 각 최적조건인 pH 9.0과 온도  $55^{\circ}\text{C}$  및 pH 8.0과  $50^{\circ}\text{C}$ 로 유지하였다. 반응혼합물의 pH는 pH자동조절기를 이용하여 각 단계별로 선정된 효소의 최적 pH로 고정시키고, 가수분해 반응 중 pH가 그 이하로 떨어지면 알칼리 공급펌프가 자동적으로 작동되어 1N NaOH가 가해져 최적 pH로 조절되며, 온도는 열판교반기로 조절되었으며, 교반속도는 반응기에 자석막대를 넣고 stirer No.5에 고정시켜 반응과정 중 일정하게 유지되도록 조절하였다.

#### 2) 한외여과막

1단계 및 2단계 막반응기에 사용된 한외여과막은 가수분해물의 분자량이 10,000 이하(1단계) 및 5,000 이하(2단계)만이 유출되는 10,000 MWCO(A/G Technology Co., Model UFP-10-C-4) 및 5,000 MWCO(A/G Technology Co., Model UFP-5-C-4)를 사용하였다. 각각의 한외여과막의 특성에 관해서는 Table 1에 나타내었다.

#### 3) 유출속도의 조절

각 단계별 막반응기 장치에서 한외여과막을 통한 유출속도는 가수분해물이 유출되는 출구에 유량계를 설치하여 측정하였으며, 각 막반응기에 설치한 압력조절밸브로 유출속도를 조절하였다.

#### 4) 유출속도에 미치는 순환속도의 측정

1단계 및 2단계 막반응기에서 순환속도에 의한 유출속도에 미치는 영향을 측정하기 위해 반응기에 1%(w/v) 젤라틴 용액 500 ml를 넣고  $55^{\circ}\text{C}$ 로 조절한 다음 1N NaOH로 pH 9.0으로 조절하여 순환속도를 측정하였다.

#### 5) 유출속도에 미치는 압력의 영향

1단계 막반응기 장치에 각각 증류수와 1, 2, 4 및 6%(w/v)의 젤라틴 용액 500 ml를 넣고 온도  $55^{\circ}\text{C}$ , pH 9.0로

Table 1. Specification of hollow fiber membrane used in the two-stage membrane reactor

Characteristics	1st-SCMR	2nd-SCMR
Manufacture company	A/G technology	A/G technology
Membrane type	UFP10C4	UFP5C4
Cartridge diameter (inches)	3/4	3/4
Cartridge length (inches)	14.25	14.25
Internal diameter (mm)	0.5	0.5
Surface area (ft <sup>2</sup> )	0.7	0.7
Max. operating pressure (psi)	25	25
pH range	2~13	2~13
Max. operating temperature (°C)	80	80
Molecular weight cut off	10,000	5,000
Material	Polysulfon	Polysulfon

조절한 다음, 순환속도를 0.86 l/min(Masterflex No. 5)로 일정하게 유지시켜 압력변화에 따른 유출속도를 측정하였다. 2단계 막반응기에서도 증류수와 0.5, 1, 2, 4 및 6%(w/v)의 1단계 가수분해물 용액 500 ml를 넣고 1단계 막반응기에서의 동일한 방법으로 압력변화에 따른 유출속도를 측정하였다.

6) 회분식 및 2단계 막반응기에서의 반응속도 상수( $K_m$ ,  $V_{max}$ ) 측정

회분식 반응기에서 trypsin으로 가자미피 젤라틴을 가수분해할 때 반응속도 상수는 다음과 같은 방법으로 측정하였다. 즉 회분식 반응기에 각각 0.05, 0.1, 0.25, 1.0 및 2.0%(w/v)인 가자미피 젤라틴 용액 100 ml를 넣고, 55°C로 가열한 다음 0.5N NaOH로 pH 9로 조절하였다. 각각의 가자미피 젤라틴 용액에 효소용액 0.06 mg/ml을 가하여 반응시키면서 2분 동안 15초 간격으로 반응혼합물 2 ml를 취하여 20%(w/v)의 삼염화아세트산 용액 2 ml가 들어있는 시험관에 넣고 vortex mixer 상에서 1분간 교반한 후 원심분리(1,500×g, 10 min)하였다. 상층액 2 ml를 취하여 질소량을 Lowry 등<sup>19)</sup>의 방법으로 측정하여  $K_m$ 값과  $V_{max}$ 값을 계산하였다.

1단계 막반응기에서 trypsin으로 가자미피 젤라틴을 가수분해할 경우, 각각 0.5, 1, 2, 4, 및 6%(w/v)의 젤라틴용액 500 ml를 각각 반응기에 넣고, 55°C, pH 9.0으로 조절한 후, 0.1 mg/ml의 효소량을 가하여 반응시켰다. 반응혼합물의 순환속도는 0.86 l/min으로 고정시켜 놓고 압력밸브를 이용하여 유출속도를 6.14 ml/min으로 조절하였다. 막을 통과한 가수분해물을 10분 간격으로 120분 동안 2 ml씩 분취하여 회분식 반응기에서의 같은 방법으로 구하였다.

2단계 막반응기 작동에서는 1단계 가수분해물을 pro-

nase E의 기질로 사용하여 pH 8.0, 온도 50°C로 조절하고 그의 다른 조건은 1단계 막반응기에서의 동일한 조건과 방법으로 측정하여 반응속도 상수를 구하였다.

#### 연속식 2단계 막반응기에서 가수분해조건 구명

##### 1) 효소농도

1단계 막반응기에서는 1%(w/v) 가자미피 젤라틴용액 500 ml를 반응기에 넣고 온도 55°C, pH 9.0(1N NaOH)으로 조절한 후, 여기에 효소농도를 반응부피에 대해 각각 0.01, 0.02, 0.04, 0.06, 0.1, 0.2, 0.3 및 0.5 mg/ml가 되도록 효소를 증류수 5 ml에 녹여 가한 후, 10분 간격으로 120분간 3 ml씩 취하여 20% 삼염화아세트산용액 3 ml가 들어있는 시험관에 넣어 vortex mixer 상에서 1분간 교반한 다음 원심분리(1,500×g, 15 min)한 상층액의 가용성 질소를 micro-Kjeldahl법으로 측정하여 가수분해도를 구하였다. 가수분해도는 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{가수분해도(\%)} = \frac{\text{가용성 질소량}}{\text{총질소량}} \times 100$$

2단계 막반응기에서는 pronase E의 기질로서 1%(w/v)의 1단계 가수분해물용액 500 ml를 pH 8.0, 온도 50°C로 조절하여 효소농도를 반응부피에 대해 각각 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 및 0.5 mg/ml가 되도록 효소를 증류수 5 ml에 녹여 가한 후 1단계 막반응기에서의 같은 방법으로 가수분해도를 구하였다.

##### 2) 기질농도

1단계 막반응기에서 기질농도의 영향은 다음과 같은 조건으로 측정하였다. 즉, 0.5, 1, 2, 4 및 6%(w/v)의 가자미피 젤라틴 용액 500 ml를 반응기에 넣고 55°C, pH 9.

0으로 조절한 다음, 각 기질용액의 부피에 대해 효소량이 0.1 mg/ml가 되도록 효소를 증류수 5 ml에 녹여 가한 후 유출속도를 6.14 ml/min로 조절하여 효소농도에서와 같은 방법으로 가수분해도를 구하였다.

2단계 막반응기에서는 1단계 가수분해물용액 500 ml를 온도 50°C, pH 8.0으로 조절한 후, 각 기질용액의 부피에 대해 0.3 mg/ml가 되도록 효소를 증류수 5 ml에 녹여 가하고, 1단계 막반응기에서와 같은 방법으로 가수분해도를 구하였다.

### 3) 기질 대 효소비

1단계 막반응기에서 1%(w/v)의 가자미피 젤라틴 용액 500 ml를 반응기에 넣고 온도 55°C, pH 9.0으로 조절한 다음, 기질 대 효소비가 각각 25, 50, 100, 200, 500, 1000 및 2000(w/w)이 되도록 효소를 증류수 5 ml에 녹여 가한 후, 유출속도 6.14 ml/min에서 효소농도에서와 같은 방법으로 하여 가수분해도를 구하였다.

2단계 막반응기에서는 1%(w/v)의 1단계 가수분해물 용액을 온도 50°C, pH 8.0으로 조절한 다음, 기질 대 효소비를 각각 달리하여 pronase E를 사용하여 1단계 막반응기에서와 같은 방법으로 가수분해도를 구하였다.

### 4) 반응용액의 부피

1단계 막반응기에서의 1%(w/v)의 가자미피 젤라틴 용액 400, 500, 600, 800 및 1000 ml를 반응기에 넣고 온도 55°C, pH 9.0으로 조절한 다음, 여기에 각 반응부피에 대해 효소량이 0.1 mg/ml(S/E=100, w/w)가 되도록 효소를 증류수 5 ml에 녹여 가한 후, 유출속도 6.14 ml/min에서 효소농도에서와 같은 방법으로 가수분해도를 구하였다.

2단계 막반응기에서는 1단계 가수분해물 1%(w/v) 용액의 반응부피에 대해 효소량이 0.3 mg/ml(S/E=33.33, w/w)가 되도록 효소를 증류수 5 ml에 녹여 가한 후, 반응용액의 부피를 각각 달리하여 1단계 막반응기에서와 같은 방법으로 반응부피에 대한 가수분해도를 계산하였다.

### 5) 유출속도

1단계 막반응기 장치에서 1%(w/v) 가자미피 젤라틴 용액 600 ml를 반응기에 넣고 55°C, pH 9.0(1N-NaOH)으로 조절한 다음, 반응부피에 대해 효소량이 0.1 mg/ml가 되도록 효소를 증류수 5 ml에 녹여 가한 후, 유출속도를 6.14, 10.0, 14.88, 19.67 및 28.83 ml/min으로 변화시키면서 효소농도에서와 같은 방법으로 가수분해도를 구하였다.

2단계 막반응기의 경우 1%(w/v)의 1단계 가수분해물을 온도 50°C, pH 8.0으로 조절한 후 pronase E를 사

용하여 상기와 동일한 방법으로 실시하였다.

## 연속식 2단계 막반응기에서 효소의 안정성에 미치는 인자

### 1) 효소의 누출

막반응기 장치에서 막을 통한 효소의 누출량을 측정하기 위해 각 단계별 가수분해 최적조건에서 행하였다. 1단계 막반응기에서 증류수 600 ml를 반응기에 넣고 온도 55°C, pH 9.0으로 조절한 다음, 반응부피에 대해 효소량이 1 mg/ml가 되도록 효소를 증류수 5 ml에 녹여 가한 후, 순환속도 0.86 l/min, 유출속도 6.14 ml/min에서 막을 통해 누출되는 효소량을 Lowry 법<sup>19)</sup>으로 측정하였다. 2단계 막반응기에서는 온도 50°C, pH 8.0으로 조절한 후, pronase E를 사용하여 1단계 막반응기에서와 같은 방법으로 측정하였다.

### 2) 막반응기 장치의 기계적인 전단응력 및 막이 효소활성에 미치는 영향

막반응기 장치에 의한 효소활성 변화율을 구하기 위한 대조구로써 회분식 반응기에서 실시하였다. 즉, 회분식 반응기에 증류수 600 ml를 넣고 온도 55°C, pH 9.0으로 조절한 후, 반응부피에 대해 효소량이 1 mg/ml가 되도록 효소를 증류수 5 ml에 녹여 가한 다음, 반응기로부터 10분 간격으로 1 ml를 취하여 미리 온도 55°C, pH 9.0으로 조절된 1%(w/v) 가자미피 젤라틴용액 4 ml와 혼합하여 10분 동안 반응시킨 후, 20%(w/v) TCA 용액 5 ml를 가하여 TCA가용물에 존재하는 질소량을 측정하여 효소활성을 구하였다.

1단계 막반응기 장치의 작동시 기계적인 전단응력에 의한 효소활성에 미치는 영향을 측정하기 위하여 증류수 600 ml를 반응기에 넣고, 온도 55°C, pH 9.0으로 조절한 다음, 반응부피에 대해 효소량이 1 mg/ml가 되도록 효소를 증류수 5 ml에 녹여 가한 후, 유출속도 6.14 ml/min, 순환속도 0.86 l/min로 작동시키면서 회분식에서와 같은 방법으로 효소활성을 구하였다. 상기와 동일한 조건하에서 막이 효소활성에 미치는 영향을 측정하기 위하여 막을 Tygon tubing으로 교체한 장치에서 효소활성도 구하였다.

2단계 막반응기의 경우 반응기 중의 증류수를 온도 50°C, pH 8.0으로 조절한 후, 반응부피에 대해 효소량이 1 mg/ml가 되도록 효소를 증류수 5 ml에 녹여 반응기에 넣고, 1단계 막반응기에서와 같은 방법으로 실시하였으며, 동일한 조건하에서 2단계 막이 효소활성에 미치는 영향은 1단계 막반응기에서와 같은 방법으로 하여 효소활성을 구하였다.

효소의 안정성(%)=

$$\frac{\text{시간 } t \text{에서 효소활성, } E_t(\text{mgN/ml})}{\text{반응 초기 효소의 활성, } E_0(\text{mgN/ml})} \times 100$$

3) 1단계 막반응기에서의 기질농도 한계

1단계 막반응기에서 많은 양의 가수분해물을 얻기 위하여 젤라틴 농도를 높여 상기의 최적조건하에서 가수분해도를 측정하였다. 즉, 10, 15, 20 및 25%(w/v)의 가자미피 젤라틴용액 600 ml를 반응기에 각각 넣고 온도 55°C, pH 9.0, 순환속도 0.86 l/min, 유출속도 6.14 ml/min으로 조절한 후 S/E=100(w/w)이 되도록 효소를 가하여 120분 동안 가수분해하여 막을 통해 유출되는 가수분해물의 질소량을 micro-Kjeldahl법으로 측정하여 가수분해도를 계산하였다.

4) 연속식 2단계 막반응기에서의 생산량 측정

1단계 막반응기 장치에서 가자미피 젤라틴의 가수분해시 가수분해물의 생산량을 측정하기 위하여 상기에서 구명한 1단계 막반응기에서의 가수분해 최적조건하에서 실시하였다. 즉, 온도 55°C, pH 9.0으로 조절된 10%(w/v) 가자미피 젤라틴 용액 600 ml를 반응기에 넣고, 반응부피에 대해 효소량이 1 mg/ml가 되도록 효소를 가한 후 순환속도 0.86 l/min, 유출속도 6.14 ml/min으로 고정시키고, 반응과정 중 반응용액의 부피를 일정하게 유지되도록 10%(w/v) 가자미피 젤라틴 용액(55°C, pH 9.0)을 유출속도와 동일한 속도로 기질을 공급하였다. 가수분해물의 생산량은 막을 통해 유출되는 가수분해물의 질소량을 측정하여 아래 식을 이용하여 계산하였다.

2단계 막반응기 장치의 경우 1단계 가수분해물 10% (w/v)용액 600 ml를 온도 50°C, pH 8.0으로 조절한 다음, 기질용액의 반응부피에 대해 효소량이 3 mg/ml가 되도록 효소를 가한 후, 1단계 막반응기에서와 같은 방법으로 하여 생산량을 측정하였다.

각 단계별 막반응기에서 가수분해물의 생산량은 한의 여과막을 통해 유출되는 가수분해물의 질소량으로 측정하여 Cheryan과 Deeslie<sup>20)</sup>의 방법에 따라 순간 생산량(P<sub>i</sub>) 또는 누적 생산량(P<sub>c</sub>)으로 나타내었다.

$$P_i(\text{mgN/mgE}) = \frac{\bar{P}J}{EV}$$

- 여기서 P<sub>i</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)

$$P_c = \Sigma P_i$$

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

결과 및 고찰

회분식에서 효소선별

가자미피 젤라틴에 대한 각종 단백질 분해효소의 활성을 "pH-drop"법으로 기질에 대한 효소의 활성을 비교 검토한 결과는 Fig. 2에 나타난 바와 같이 pronase E 및

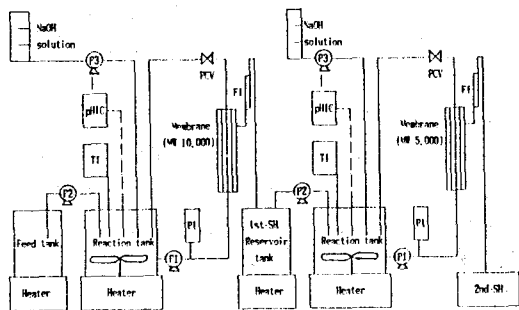


Fig. 1. Schematic diagram of the recycle two-stage membrane reactor for the production and separation of enzymatic flounder skin gelatin hydrolysates.

TI: Temperature indicator, PI: Pressure indicator, FI: Flow indicator, P1: Recycling pump, P2: Feed pump, PCV: Pressure control valve, FCV: Flow control valve, pHIC: pH indicator controller, 1st-SH: 1st-step hydrolysate, 2nd-SH: 2nd-step hydrolysate.

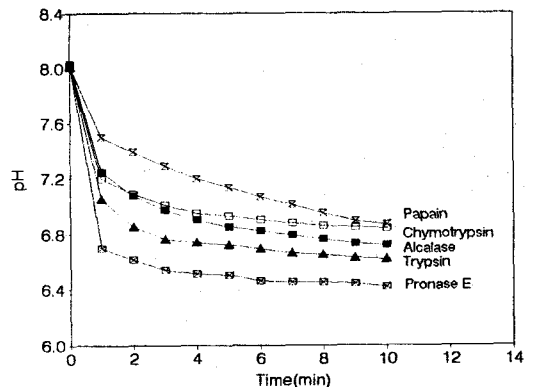


Fig. 2. Comparison of the proteolytic activity of Alcalase,  $\alpha$ -chymotrypsin, papain, trypsin and pronase E on 1% (w/v) flounder skin gelatin. Conditions include substrate as flounder skin gelatin, S/E=21.3 (w/w).

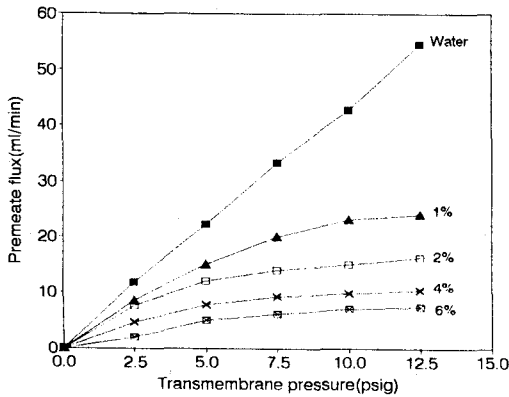


Fig. 3. Effect of transmembrane pressure on permeate flux with flounder skin gelatin concentration in the 1st-SCMR (pH 9.0, 55°C, recycling rate 0.86 l/min).

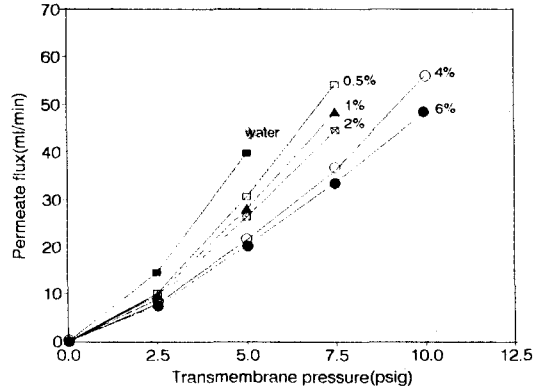


Fig. 4. Effect of transmembrane pressure on permeate flux with 1st-step hydrolysate concentration in the 2nd-SCMR (pH 8.0, 50°C, recycling rate 0.86 l/min).

trypsin이 다른 단백질 분해효소보다 pH가 급격히 감소하는 것으로 보아 다른 효소에 비해 가자미피 젤라틴에 대한 가수분해 활성이 높은 것을 알 수 있었다. 따라서 본 실험에서 trypsin을 1단계 막반응기에서 가자미피 젤라틴의 분해효소로 사용하였고, 2단계 막반응기에서는 pronase E를 가수분해효소로 사용하였다. 김 등<sup>21)</sup>은 pH-drop법을 이용하여 1%(w/v) 대구피 용액에 대한 collagenase, trypsin, pronase E, collagenase/trypsin, collagenase/pronase E의 활성을 비교한 결과, pronase E가 활성이 매우 높았다고 보고하였고, Bhumiratana 등<sup>22)</sup>은 trypsin이 어육단백질농축물(FPC)에 대해 chymotrypsin이나 papain보다 더 높은 반응성을 가진다고 보고한 바 있다.

**연속식 2단계 막반응기를 이용한 젤라틴의 가수분해**

**1) 막반응기 장치조건 설정**

막반응기에서 가수분해물의 유출속도는 유출구에 유량계를 설치하여 측정하였다. 막반응기에 pH 9.0, 50°C 로 조절된 증류수를 넣고, 막반응기를 작동시켜 막을 통해 유출되는 양 10 ml씩을 얻는데 걸리는 시간을 측정하여 유량계의 눈금(flowmeter reading)에 대한 유출속도를 측정하였다. 1단계 막반응기에서 유출속도에 대한 회귀 직선 방정식은  $Y=0.460 \times F - 4.033$ 였으며, 2단계 막반응기의 경우는  $Y=0.437 \times F - 2.598$ 이었다.

1단계 막반응기에서 순환속도에 따른 유출속도는 Masterflex No. 5까지는 유출속도가 거의 비례적으로 증가하다가 그 이후에는 완만하게 증가하는 경향을 보였다. 따라서 1단계 막반응기에서는 Masterflex No. 5에서 작

동하는 것이 가장 효율적이라 판단되었다.

1단계 막반응기에서 유출속도에 미치는 투과압력의 영향은 Fig. 3과 같이 증류수의 유출속도는 투과압력의 증가에 따라 비례적으로 증가하였지만, 각 기질농도에 따른 유출속도는 투과압력의 증가에 따라 유출속도의 증가폭이 감소하는 경향을 보였으며, 기질농도가 높을수록 유출속도는 감소하는 경향을 나타내었다. 1%(w/v) 이상의 가자미피 젤라틴 용액은 7.5 psig 이상에서는 유출속도가 거의 일정하였다. 그러나 2단계 막(MWCO 5,000)의 pore size는 1단계 막(MWCO 10,000)에 비해 1/2 정도임에도 불구하고 모든 기질농도에서 투과압력에 따라 유출속도가 급격히 증가하였는데, 이 같은 결과는 1단계 막반응기에서 trypsin으로 가수분해된 젤라틴 가수분해물을 기질로 사용하였기 때문이라 판단된다(Fig. 4).

**2) 반응속도 상수( $K_m$  및  $V_{max}$ )**

회분식 반응기에서의 기질농도 변화에 따른 효소활성을 측정하여 Lineweaver-Burk 방법에 따라 plot한 결과는 Fig. 5와 같다. 기질 농도 1%(w/v) 이상에서는 기질저해가 나타났으며, 그 보다 낮은 기질농도에서 계산된 trypsin의 젤라틴에 대한  $K_m$  및  $V_{max}$  값은 각각 0.668 mgN/ml, 1.468 mgN/ml/min이었다. 1단계 막반응기에서 반응속도 상수를 측정하기 위하여 각 기질농도에 따른 효소적 가수분해물의 시간변화에 따른 생성량을 측정하여 Lineweaver-Burk plot한 결과는 Fig. 6과 같다. Michaelis-Menten 상수  $K_m$  및  $V_{max}$  값은 각각 1.618 mgN/ml 및 0.347 mgN/ml/min였다. 2단계의 경우,  $K_m$  및  $V_{max}$  값은 각각 4.970 mgN/ml, 0.279 mgN/ml/min였다(Fig. 7).

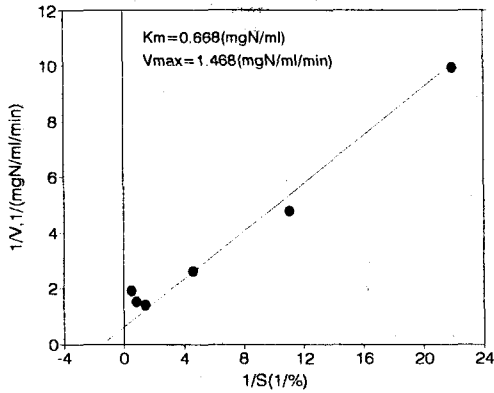


Fig. 5. Lineweaver-Burk plot for trypsin-flounder skin gelatin hydrolysis in the batch reactor (55°C, pH 9.0, E=0.06mg/ml).

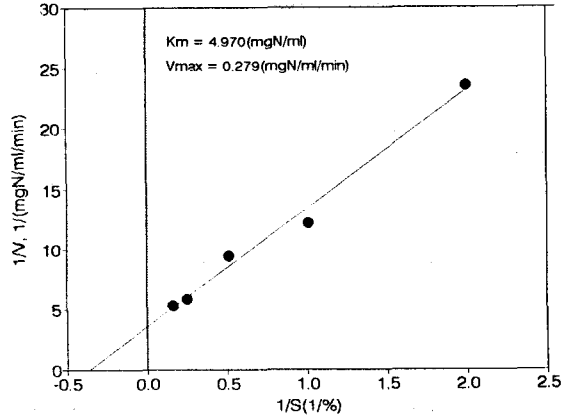


Fig. 7. Lineweaver-Burk plot for pronase E-1st-step hydrolysate in the 2nd-SCMR (E=0.1 mg/ml, pH 8.0, 50°C, flow rate 6.14 ml/min; V=500 ml, recycling rate 0.86 /min).

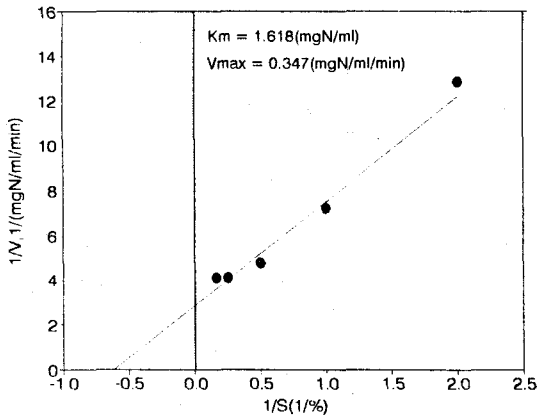


Fig. 6. Lineweaver-Burk plot for trypsin-flounder skin gelatin hydrolysis in the 1st-SCMR (E=0.1 mg/ml, pH 9.0, 55°C, flow rate 6.14 ml/min, V=500 ml, recycling rate 0.86 /min).

Mannheim<sup>23)</sup>은  $K_m$ 값이 막반응기에서 최적 기질농도의 추정에 이용될 수 있으며,  $K_m$ 값보다 낮은 기질농도에서는 반응속도가  $V_{max}$ 값보다 매우 낮기 때문에 측매능을 잃게 되고,  $K_m$ 값보다 높은 기질농도에서는 반응혼합물의 고형물의 증가를 초래한다고 보고하였다. Bliss와 Hultin<sup>24)</sup>은 pronase로 casein의 가수분해시  $K_m$ 값이 1.67%였다고 보고하였다. 또한 김 등<sup>21)</sup>은 pronase에 의한 대구피 가수분해시  $K_m$  및  $V_{max}$ 값은 각각 1.82 mgN/ml, 0.06 mgN/ml/min였고, Deeslie<sup>25)</sup>은 pronase E로 대두단백질을 가수분해시  $K_m$ ,  $V_{max}$  값은 각각 1.15%, 0.303 mgN/ml/min였으나 가열한 시료에서는 각각 0.75%(w/

Table 2. Kinetic constants for batch reactor and two-stage membrane reactor

Kinetic constants	Batch	1st-SCMR	2nd-SCMR
$K_m$ (mgN/ml)	0.668	1.618	4.970
$V_{max}$ (mgN/ml/min)	1.468	0.347	0.279
* $K_2$ (1/min)	135.580	19.260	15.480
$V_{max}/K_m$ (1/min)	2.200	0.214	0.056
$R^2$	0.988	0.990	0.986

\* $K_2 = V_{max}/E$  (1/min)

v), 0.125 mgN/ml/min였다고 보고한 바 있다.

각 단계별 반응속도 상수( $K_m$ ,  $V_{max}$ )는 Table 2에 요약해서 나타내었다. 회분식에서는 기질저해가 있었지만, 1단계 및 2단계 막반응기에서는 기질저해가 나타나지 않았다. 회분식에 비해 1단계 및 2단계 막반응기에서  $K_m$ 값은 각각 2배 및 7배 정도 큰 반면,  $V_{max}$ 값은 4배 및 5배 정도 낮았다. 이와 같이 회분식에 비해 각 단계별 막반응기에서 효소와 기질의 친화력이 낮게 나타나는 것은 효소의 일부가 누출되었거나 막표면에 효소의 흡착으로 인한 활성저해, 반응혼합물의 순환에 의한 기계적인 전단응력(shearing forces) 등 여러 인자에 기인되는 것으로 판단된다.

연속식(1단계)에서  $V_{max}$ 값이 회분식에 비해 4.2배 정도 낮은 것은 위에서 설명한 원인들에 의해 막반응기 장치에서 trypsin 활성이 감소된 것으로 판단된다. 기질에 대한 효소의 친화도의 척도로서  $V_{max}/K_m$ 비가 클수록 기

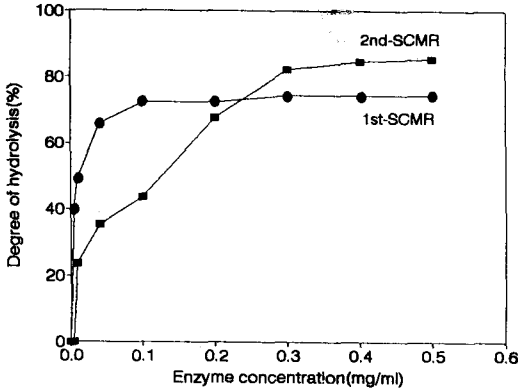


Fig. 8. The effect of enzyme concentration on the degree of hydrolysis in the 1st-SCMR (pH 9.0, 55°C) and 2nd-SCMR (pH 8.0, 50°C) [S=1% (w/v), flow rate 6.14 ml/min, V=500 ml].

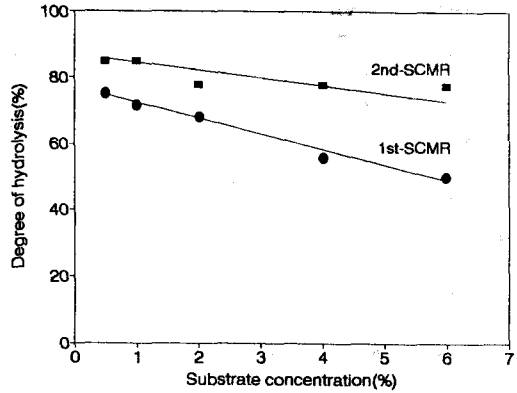


Fig. 9. The effect of substrate concentration on the degree of hydrolysis in the 1st-SCMR (pH 9.0, 55°C) and 2nd-SCMR (pH 8.0, 50°C) (flow rate 6.14 ml/min, V=500 ml).

질과 효소의 친화도는 크게 되는데, 회분식에 비해 막 반응기에서  $V_{max}/K_m$ 비가 10배 정도 낮게 나타났다.

**연속식 2단계 막반응기에서 젤라틴 가수분해 조건**

**1) 효소농도**

1단계 및 2단계 막반응기에서 각각 1%(w/v) 기질용액에 효소농도에 따른 가수분해도를 측정 한 결과는 Fig. 8과 같다. 1단계의 경우, 1%(w/v) 기질에 대해 효소농도가 0.1 mg/ml까지는 가수분해도가 급격히 증가하다가 그 이상으로 효소농도가 증가하여도 가수분해도는 74%로 거의 일정하였다. 따라서 효소농도는 0.1 mg/ml(S/E=100, w/w)가 적합하다고 판단되었다.

2단계 막반응기에서는 1%(w/v) 기질에 대해 효소농도 0.3 mg/ml까지는 가수분해도가 비례적으로 증가하다가 그 이상의 효소농도에서는 가수분해도가 82%로 거의 일정하게 유지되었다. 따라서 2단계 막반응기에서 효소농도는 0.3 mg/ml(S/E=33, w/w)로 결정하였다.

Bhumiratana 등<sup>22)</sup>은 막반응기에서 어육단백질을 효소로 가용화시 0.5 mg/ml이 적합하다고 보고하였으며, Mannheim과 Cheryan<sup>26)</sup>은 casein을 Alcalase로 가수분해시 효소농도가 0.12 mg/ml가 적당하였다고 하였다. Payne 등<sup>27)</sup>은 환외여과막 반응기에서 녹염단백질을 trypsin농도가 S/E=500(w/w)되게 가하여 4시간 가수분해시켰을 때 가수분해도는 97%였다고 보고한 바 있다.

**2) 기질농도 및 기질 대 효소비**

1단계 및 2단계 막반응기에서 일정한 효소량에 대하여 기질농도의 변화에 따른 가수분해도는 Fig. 9와 같다. 1단계 막반응기의 경우, 기질 1%(w/v)이하의 젤라틴 용

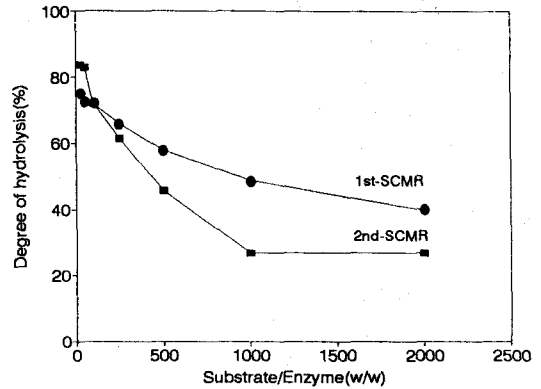


Fig. 10. The effect of substrate to enzyme ratio (w/w) on the degree of hydrolysis in the 1st-SCMR (pH 9.0, 55°C) and 2nd-SCMR (pH 8.0, 50°C) [S=1% (w/v), flow rate 6.14 ml/min, V=500 ml].

액에서는 가수분해도가 70%이상으로 나타났으나, 기질농도가 그 이상으로 증가함에 따라 가수분해도는 다소 감소하는 경향을 보였다. 또한, 기질농도가 낮을수록 정상상태에 도달되는 시간은 단축되었지만 생산성은 오히려 낮아지는 경향을 보였다. 이같은 결과는 회분식 반응기에서 관찰되었던 기질저해가 막반응기에서는 나타나지 않았기 때문이라고 생각된다. 2단계 막반응기에서는 1단계에 비해 기질농도의 증가에 따른 가수분해도의 감소는 낮았으나 그 경향은 유사하였다.

1단계 및 2단계 막반응기에서 기질 대 효소비(S/E, w/w)의 변화에 따른 가수분해도는 Fig. 10과 같이 1단계에서 기질 대 효소비가 증가할수록 가수분해도는 감



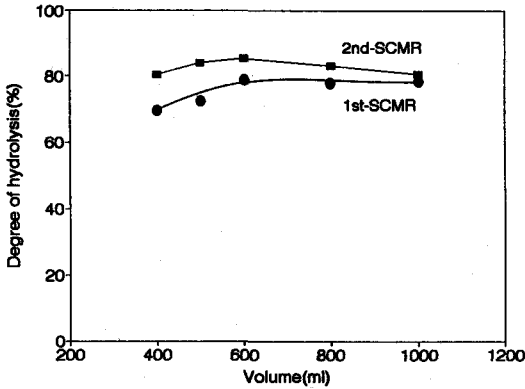


Fig. 11. The effect of reactor volume on the degree of hydrolysis in the 1st-SCMR (pH 9.0, 55°C) and 2nd-SCMR (pH 8.0, 50°C) [S=1% (w/v), flow rate 6.14 ml/min].

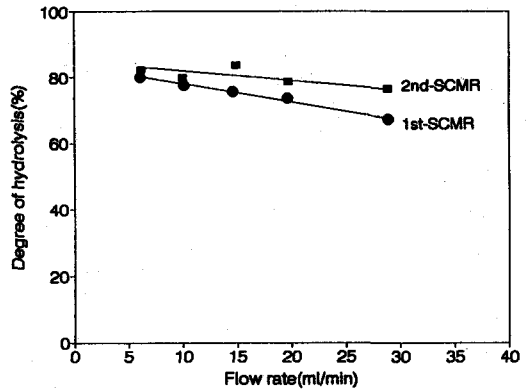


Fig. 12. The effect of flow rate on the degree of hydrolysis in the 1st-SCMR (pH 9.0, 55°C) and 2nd-SCMR (pH 8.0, 50°C) [S=1% (w/v), V=600 ml].

소하는 경향을 보였으며, 1000(w/w)에서 20(w/w)으로 낮아졌을 때 가수분해도는 약 1.5배 높았으며, 100(w/w)에서의 가수분해도는 73%였다. 기질 대 효소비가 20(w/w)에서 가수분해도는 가장 높았으며, Fig. 8의 결과를 고려하여 기질 대 효소비를 100(w/w)으로 결정하였다.

2단계 막반응기의 경우는 기질 대 효소비가 50(w/w) 이하일 때 가수분해도는 80% 이상이였으며, 기질 대 효소비는 Fig. 8를 고려하여 33(w/w)으로 결정하였다. Deeslie와 Cheryan<sup>28)</sup>은 대두단백질을 pronase E로 연속적 가수분해시 최적 E/S비는 1/9과 1/16 사이였다고 보고한 바 있다. 반응부피 및 유출속도 1단계 및 2단계 막반응기에서 젤라틴 가수분해시 반응액의 부피변화에 따른 가수분해도를 측정된 결과는 Fig. 11과 같다. 각 단계의 막반응기에서 반응부피 400 ml 이하에서는 기계적장치의 제한으로 재순환이 불가능하였으며, 부피가 600 ml 이상에서는 가수분해도가 거의 일정하였다. 이러한 반응부피의 영향은 일정한 유출속도에서 효소와 기질이 접촉하여 반응할 수 있는 시간적 차이에 의해 결정되는 것으로 추측된다.

1단계 및 2단계 막반응기에서 유출속도에 따른 가자미피 젤라틴의 가수분해도를 측정된 결과는 Fig. 12와 같다. 유출속도가 증가할수록 정상상태에 도달하는 시간은 빨랐지만, 가수분해도는 약간 감소하는 경향을 보였다. 이 결과는 반응부피의 영향과 동일한 원인으로 빠른 유출속도로 인해 반응기내에서 기질과 효소가 작용할 시간이 감소되기 때문이라고 생각된다. 따라서, 본 실험에서 유출속도는 가수분해도가 79%을 나타내는 6.14 ml/min으로 정하였다. 2단계 막반응기의 경우도 1단계

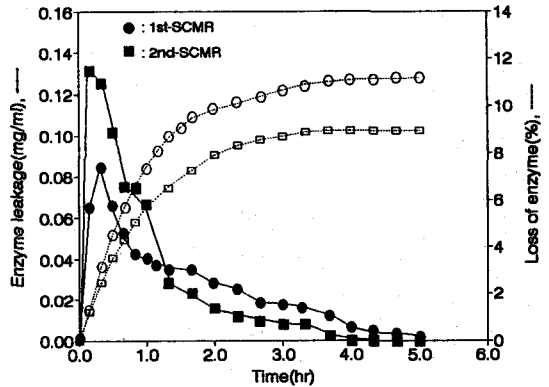


Fig. 13. The leakage of trypsin and pronase E in the 1st-SCMR (pH 9.0, 55°C) and 2nd-SCMR (pH 8.0, 50°C), respectively [E=1 mg/ml, flow rate 6.14 ml/min, V=600 ml, recycling rate 0.86 l/min].

의 결과와 비슷한 경향을 나타내었다.

### 단계별 막반응기에서 효소의 안정성에 미치는 인자

#### 1) 효소의 누출

1단계 및 2단계 막반응기의 최적 가수분해조건하에서 막을 통해 누출되는 효소량을 측정된 결과는 Fig. 13과 같다. 1단계는 막반응기 작동시간 20분에서 0.087 mg/ml로 가장 많이 누출되었으며, 그 이후 1시간 20분까지 급격히 감소하다가 5시간에는 거의 누출되지 않았다. 이때의 전체 효소 누출량은 11.5%였다.

2단계의 경우, 막반응기 작동시간 10분에서 0.131 mg/ml로 가장 많이 누출되었으나, 그 이후 2시간까지 급

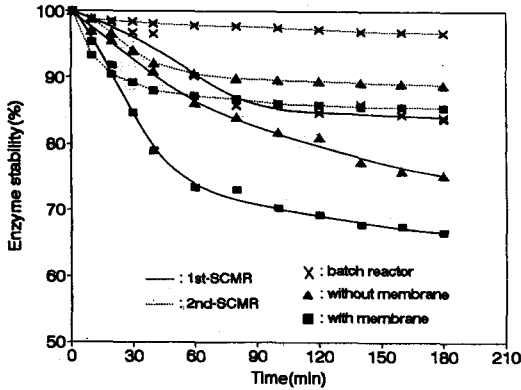


Fig. 14. Effects of membrane and mechanical shear rate on enzyme stability in the 1st-SCMR and 2nd-SCMR.

격히 감소하다가 4시간 이후에는 거의 누출되지 않았다. 이 때의 전체 효소누출량은 9.0%였다. 2단계 막반응기에서 효소의 누출은 1단계 막반응기에 비해 막의 pore size가 배로 작기 때문에 효소의 누출량이 적은 것으로 판단되었다.

Mannheim<sup>23)</sup>은 막반응기를 이용하여 Alcalase로 casein을 가수분해시 효소의 누출량을 측정된 결과, 온도 37℃, 50℃에서 각각 효소의 누출량은 57%, 52%였으며, 반응기 조작 90분 이내의 유출용액에서만 단백질 분해 활성을 측정할 수 있었다고 하였으며, 초기단계에서 누출된 효소는 잔류효소의 활성에 크게 영향을 미치지 않는다고 보고한 바 있다. 김 등<sup>29)</sup>은 효소누출과 반응기 안정성간에는 직접적인 상호관계는 나타나지 않아 초기 단계에서 누출된 효소는 잔류효소의 활성에 크게 영향을 미치지 않는다고 보고하였다.

2) 막반응기 장치의 기계적인 전단응력 및 막에 의한 영향

1단계 및 2단계 막반응기에서 효소의 활성에 대한 기계적인 전단응력 및 막에 의한 영향을 알아보기 위해 초기 활성을 측정된 결과는 Fig. 14와 같다.

회분식 반응기에 비해 1단계 막반응기에서 기계적인 전단응력에 의한 영향은 작동 1시간까지 효소활성이 27% 감소하였으며, 그 이후는 효소활성이 완만하게 감소하여 3시간 작동하였을 때의 효소활성은 초기활성의 34%가 저하하였다. 기계적인 전단응력과 막반응기의 영향 중에서 막에 의한 영향을 측정하기 위해 막 대신에 Tygon tubing으로 대체시킨 장치를 대조구로 사용한 결과, 작동시간 1시간까지 trypsin의 활성이 15% 감소하였으며, 반응시간이 길어짐에 따라 서서히 감소되어 반응시간

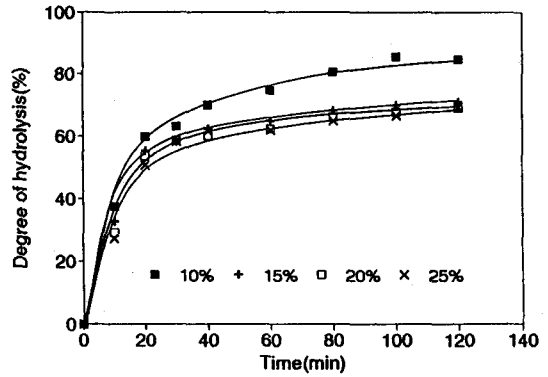


Fig. 15. Comparison of the degree of hydrolysis with substrate concentration in the 1st-SCMR [S/E=100 (w/w), pH 9.0, 55℃, flow rate 6.14 m/min, V=600 ml].

3시간에서 23%의 효소활성 저하를 나타내었다.

2단계 막반응기의 경우는 회분식 반응기에 비해 기계적인 전단응력의 영향은 작동시간 1시간까지 효소활성이 14%로 감소하였으며, 그 이후는 매우 완만하게 감소하였다. 막을 제거한 반응기에서의 pronase E의 활성은 작동시간 1시간까지 9%가 저하하였으나 그 이후에는 거의 활성 저하가 나타나지 않았다. 막에 의한 효소활성 감소는 한외여과막이 효소를 흡착하거나 활성부위에 영향을 미치는 것으로 판단된다. 효소활성에 대한 막의 영향에 대하여 Cheryan<sup>30)</sup>은 10% 정도 효소안정성간에 차이가 있었다고 보고하였다. Mannheim과 Cheryan<sup>26)</sup>은 한외여과막 반응기에서 Alcalase의 활성에 미치는 막의 영향을 측정된 결과, 막이 있을 때 60분에서 초기활성의 85%가 손실되었으며, 막을 제거시켰을 때는 30% 효소활성이 감소되었다고 보고하였으나, 본 실험에서는 이에 비해 막에 의한 효소활성의 저하가 낮았다.

3) 높은 기질농도의 한계

1단계 막반응기에서 trypsin의 최적 가수분해조건인 pH 9.0, 온도 55℃, 유출속도, 6.14 ml/min, 부피 600 ml, S/E=100(w/w)에서 기질농도를 10, 15, 20 및 25%로 변화시켜 가수분해도를 측정된 결과는 Fig. 15와 같다. 기질농도가 10%에서는 처음 반응시간 40분까지 가수분해도가 75%로 증가하였으며, 2시간 반응시킨 후 가수분해도는 89%였다. 기질농도 15, 20 및 25%에서는 반응시간 40분까지 가수분해도가 60%로 증가하였지만, 그 이후로는 가수분해도가 거의 일정하였다. 일반적으로 효소에 의한 단백질의 가수분해시 기질농도는 1~5%범위로 보고<sup>23)</sup>되어 있으므로 본 연구에서 10% 기질농도는

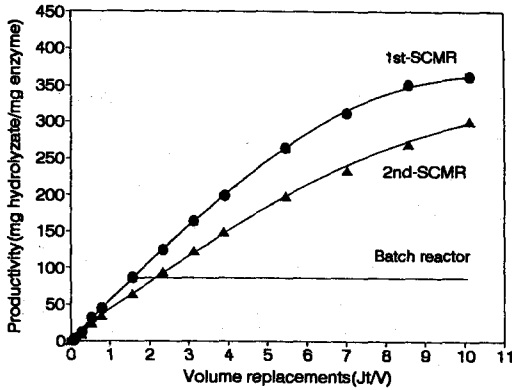


Fig. 16. Comparison of the productivities of hydrolyzate with the batch reactor and 1st-SCMR [S=10% (w/w), E=1 mg/m<sup>3</sup>, S/E=100 (w/w), pH 9.0, 55°C, flow rate 6.14 m/min, V=600 m<sup>3</sup>], 2nd-SCMR [S=10% (w/v), E=3 mg/m<sup>3</sup>, S/E=33 (w/w), pH 8.0, 50°C, flow rate 6.14 ml/min, V=600 m<sup>3</sup>], 2nd-SCMR [S=10% (w/v), E=3 mg/m<sup>3</sup>, S/E=33 (w/w), pH 8.0, 50°C, flow rate 6.14 ml/min, V=600 m<sup>3</sup>].

매우 높은 기질농도임을 알 수 있었다.

#### 4) 생산량

최적 가수분해 공정조건하에서 회분식과 연속식 2단계 막반응기에서 부피대체율에 대한 생산량의 측정 결과를 Fig. 16에 나타내었다. 1단계 가수분해물 생성량은 부피대체를 7배까지는 생산량이 비례적으로 증가하였지만, 그 이후로는 생산량이 완만하게 증가하는 경향을 나타내었다. 이와 같이 부피대체율이 증가함에 따라 생성량이 완만하게 증가하는 것은 반응기내에서 효소의 누출, 막 반응기에 의한 기계적인 전달능력, 막 등에 의해 효소의 활성이 저하되기 때문이라 생각된다. 이러한 문제는 반응기 작동 후 생산량의 감소가 나타나는 부피대체율에서 효소를 가해줌으로써 해결할 수 있을 것으로 생각된다.

회분식에서 생산량은 부피대체율에 대하여 일정하며, 효소로 반응시켜 정상상태에 도달하였을 때 생산량은 효소 mg당 가수분해물이 87 mg이었다. 이에 비해 1단계 막반응기에서의 생산량은 362 mg으로 회분식의 생산량에 비해 4배 이상 높았다. 1단계 막반응기에서는 기질에 대한 효소의 친화력이 회분식에 비해 낮았지만, 효소를 재순환시켜 사용함으로써 효소 mg당 생산량은 회분식에 비해 매우 높았다.

2단계 막반응기의 경우는 부피대체율이 5배까지 생산량이 비례적으로 증가하였으며, 부피대체율 8배에서의 생산량은 효소 mg당 250 mg이었다. 1단계 막반응기에서

부피대체율이 5배까지 생성량은 비례적으로 증가하였으며 이때의 생산량은 263 mg이었으며, 부피대체율 8배에서는 334 mg으로 2단계 막반응기에 비해 효소 mg당 생산량이 약 1.3배 높았다. 이같은 결과는 1단계 막반응기에 비해 2단계 막반응기에서 기질을 가수분해하는데 많은 양의 효소를 필요로 하기 때문에 상대적으로 효소 mg당 생산량은 낮게 나타났다.

이와 같이 각 단계별 막반응기에서 부피대체율이 증가됨에 따라 생산량이 다소 감소되는 것은 반응기내에서의 효소활성저하에 기인되는 것으로 생각된다. 기질에 대한 효소의 친화도는 회분식이 1단계 막반응기에 비해 높지만, 생산량은 막반응기에서 효소의 재순환으로 인하여 회분식보다 매우 높았다.

### 감사의 글

이 연구는 1992년도 교육부지원 학술진흥재단의 자유공모과제 학술연구조성비에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

### 참고 문헌

1. Kinsella, J. E. and Whitehead, D. M.: In Milk-the Vital Force, D. Reidel Pub. Co., Ithaca New York, p. 791(1987)
2. Turgeon, S. L., Gauthier, S. F. and Paquin, P.: J. Agric. Food Sci., 39 : 671(1991)
3. Tost, R., Monti, J. C. and Pahud, J. J.: Food Technol., 41 : 118(1988)
4. Kinsella, J. E.: J. Am. Oil. Chemists' Soc., 56 : 242 (1979)
5. Deng, Q. Y., Barefoot, R. R., Divsady, L. L., Rwbins, L. J. and Tzeng, Y. M.: Can. Inst. Food Sci. Technol. J., 23 : 440(1990)
6. Lasch, J. R., Koelsch, R. and Kretschmer, K.: Acta Biotechnol., 7 : 227(1987)
7. Kennedy, J. F., Melo, E. H. and Jumel, K.: Chem. Eng. Prog., 86 : 81(1990)
8. Sakai, G. S., Yamamoto, N., Yoshida, S., Mikuni, K., Ishigami, H. and Hara, K.: Agric. Biol. Chem. 55 : 45(1991)
9. Malcata, F. X., Hill, C. G. and Amundson, C. H.: Biotechnol. Bioeng., 39 : 984(1992)
10. Cheryan, M. and Mehaia, M. A.: Membrane bioreactor in membrane separations in biotechnology. Edited by Megregor W. C., Marcel Dekker, Inc(1986)
11. Sattlerlee, L. D., Zachariah, N. Y. and Levin, E.:

- J. Food Sci., 38 : 268(1973)
12. Monsheimer, R. and Pfeleiderer, E.: U.S. Patent, 4, 293,647(1981)
  13. Appleman, M. L.: Br. Patent 1,308,690(1973)
  14. Schwille, K., Seiz, H., Sorg, E. and Sommer, U.: Br. Patent, 1,483,953(1977)
  15. Ney, K. H.: J. Am. Oil Chemists' Soc., 56 : 295 (1979)
  16. Stanley, D. W.: Can. Inst. Food Sci. Technol. J., 14 : 49(1981)
  17. 강태중, 전유진, 김세권, 송대진: 한국수산학회지, 25 : 93(1992)
  18. Hsu, H. W., Vavak, D. L., Satterer, L. D. and Miller, G. A.: J. Food Sci., 42 : 1269(1977)
  19. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: J. Biol. Chem., 193 : 265(1951)
  20. Cheryan, M. and Deeslie, W. D.: J. Am. Oil Chemists' Soc., 60 : 1112(1983)
  21. 김세권, 양현필, 이용호: 한국생물공학회지, 6 : 327 (1991)
  22. Bhumiratana, S., Hill, JR G. and Amundson, C. H.: J. Food Sci., 42 : 1016(1977)
  23. Mannheim, A.: Master's Thesis, Dept. of Food Sci., University of Illinois, Urbana-Champaign(1989).
  24. Bliss, F. M. and Hultin, H. O.: J. Food Sci., 42 : 425 (1977)
  25. Deeslie, W. D.: Ph. D. Thesis, Dept. Food Sci., University of Illinois Urbana-Champaign(1980)
  26. Mannheim, A. and Cheryan, M.: J. Food Sci., 55 : 381(1990)
  27. Payne, R. E. and Hill, C. G.: J. Food Sci., 43 : 385 (1978)
  28. Deeslie, W. D. and Cheryan, M.: J. Food Sci., 46 : 1035(1980)
  29. 김세권, 변희국, Cheryan, M.: 한국생물공학회지, 6 : 309(1991)
  30. Cheryan, M.: Ultrafiltration Handbook. Technomic Publishing Co. Inc. Lancaster, Basel(1986)

### Continuous Production of Fish Skin Gelatin Hydrolysate Using a Two-Stage Membrane Reactor

Se-Kwon Kim\*, Hee-Guk Byun, You-Jin Jeon, Hyun-Phil Yang and Duk-Je Jou<sup>1</sup> (Department of Chemistry, National Fisheries University of Pusan, Pusan 608-737, Korea, <sup>1</sup>Department of Food Science and Technology, Dong Sae College, Pusan 616-010, Korea)

**Abstract:** A continuous two-stage membrane (1st-SCMR, MWCO 10,000; 2nd-SCMR, MWCO 5,000) reactor was developed and optimized for the production of fish skin gelatin hydrolysate with different molecular size distribution profiles using trypsin and pronase E. The optimum operating conditions in the 1st-step membrane reactor using trypsin were: temperature, 55°C; pH 9.0; enzyme concentration, 0.1 mg/ml; flux, 6.14 ml/min; reaction volume, 600 ml; and the ratio of substrate to trypsin, 100 (w/w). After operating for 1 hr under the above conditions, 79% of total amount of initial gelatin was hydrolysed. In the 2nd-step using pronase E under optimum operating conditions [temperature, 50°C; pH 8.0; enzyme concentration, 0.3 mg/ml; flux, 6.14 ml/min; reaction volume, 600 ml; and the ratio of substrate to pronase E, 33 (w/w)], the 1st-step hydrolysate was hydrolysed above 80%. Total enzyme leakages in the 1st-step and 2nd-step membrane reactors were about 11.5% at 55°C for 5hrs and 9.0% at 50°C for 4 hrs, respectively. However, there was no apparent correlation between enzyme leakage and substrate hydrolysis. The membrane has a significant effect on activity lose of trypsin and pronase E activity for 1 hr of the membrane reactors operation. The loss of initial activity of enzymes were 34% and 18% in the 1st-step and 2nd-step membrane reactor, whereas were 23% and 10% after operating time 3 hr in the 1st-step and 2nd-step membrane reactor lacking the membrane, respectively. The productivities of 1st-step and 2nd-step membrane reactor for 8 times of volume replacement were 334 mg and 250 mg per mg enzyme, respectively.