

재순환 3단계 막반응기를 이용한 어피젤라틴의 연속적 가수분해 최적화 공정 개발

김 세 권 · 변 희 국

부산수산대학교 화학과
(1994년 3월 23일 접수, 1994년 6월 13일 채택)

Development of Optimum Process for Continuous Hydrolysis of Fish Skin Gelatin Using a Three-Step Recycle Membrane Reactor

Se-Kwon Kim and Hee-Guk Byun

Dept. of Chemistry, National Fisheries University of Pusan, Pusan 608-737, Korea
(Received March 23, 1994, Accepted June 13, 1994)

요 약: 어피로부터 추출한 젤라틴을 효소로 가수분해시킨 가수분해물을 분자량 크기에 따라 분획하여 이를 기능성 소재로서 이용할 목적으로 연속식 3단계 막(1st-SMR, MWCO 10,000; 2nd-SMR, MWCO 5,000; 3rd-SMR, MWCO 1,000) 반응기 장치를 이용하여 젤라틴 가수분해 최적조건이 구명되었고, 또한 막반응기 장치를 장시간 작동하였을 때, 기계적인 응력과 막에 의한 효소활성 및 안정성에 미치는 인자, 그리고 분자량이 서로 다른 가수분해물 획분의 생산량을 높이기 위한 최적화 공정에 대하여 검토하였다. 재순환 3단계 막반응기 장치에서 pH-drop법으로 선정하여 사용한 효소는 Alcalase(1단계), pronase E(2단계)였으며, 3단계에서는 collagenase(3단계)를 사용하였다. 최적 가수분해조건은 1단계의 경우, 효소농도 0.2mg/ml, 기질대 효소비 50(w/w), 온도 50°C, pH 8.0, 반응부피 600ml 및 유출속도 6.14ml/min였으며, 2단계는 효소농도 0.3mg/ml, 기질대 효소비 33(w/w), 그외의 조건은 1단계와 동일하였다. 그리고 3단계의 경우는 효소농도 0.1mg/ml, 기질대 효소비 100(w/w) 및 유출속도는 10ml/min이었다. 1단계 막반응기를 1시간 작동하였을 때의 기계적인 전달응력 및 막에 의한 효소활성 저하는 30% 및 15%였으며, 2단계 및 3단계는 각각 14%, 5% 및 18%, 8%였다. 1단계, 2단계 및 3단계 막반응기의 최적 가수분해조건하에서 가수분해도는 각각 3.5%(Kjeldahl방법, 87%), 3.1%(77%) 및 2.7%(70%)였으며, 연속식 3단계 막반응기에서 가수분해물의 최종생산량은 부피대체율 10배에서 효소 mg당 430mg이었다.

Abstract: The enzymatic hydrolysate of gelatin extracted from fish skin was fractionated and recycled through the membrane reactor according to the molecular weight for the purpose of using as functional material. In addition, the enzymatic hydrolysis conditions of gelatin, enzyme stability by membrane and mechanical shear, and effect on the long-term operational stability of the recycle membrane reactor were investigated. Using the pH-drop technique, Alcalase, pronase E and collagenase were identified as the most suitable enzymes for the hydrolysis of fish skin gelatin. The optimum hydrolysis conditions in the 1st-step membrane reactor(1st-SMR) by Alcalase were enzyme concentration 0.2mg/ml, substrate-to-enzyme ratio(S/E) 50(w/w), 50°C, pH 8.0, reaction volume 600ml and flow rate 6.14ml/min. In the 2nd-SMR by pronase E were enzyme concentration 0.3mg/ml, S/E 33(w/w), 50°C, pH 8.0, reaction volume 600ml and

flow rate 6.14ml/min. In the case of 3rd-SMR, enzyme concentration 0.1mg/ml, S/E 100(w/w), 37°C, pH 7.5, reaction volume 600ml and flow rate 10ml/min. Decreased enzyme activities by mechanical shear and membrane were 30% and 15% in the 1st-SMR, were 14% and 5% in the 2nd-SMR, and 18% and 8% in the 3rd-SMR, respectively. Under the optimum conditions, the degree of hydrolysis in the 1st, 2nd and 3rd-SMR were 3.5%(Kjeldahl method, 87%), 3.1%(77%) and 2.7%(70%), respectively. The productivity of hydrolysate in the continuous three-step membrane reactor was 430mg per enzyme(mg) for 10 times of volume replacements.

1. 서 론

최근 특별한 기능을 갖는 단백질의 수요가 늘어남에 따라 단백질의 기능성을 개량하려는 연구가 활발히 이루어지고 있다[1-4]. 이들 중 대표적인 것이 단백질을 단백질 분해효소로 처리한 가수분해물을 환자의 영양강화제와 같은 의약품이나 기능성이 요구되는 식량소재로서 이용하려는 시도이다. 특히, 우유단백질의 가수분해물은 항원을 파괴하는데 효과적이라는 것이 밝혀졌다[5, 6].

현재 단백질의 가수분해물은 주로 산 또는 알칼리에 의한 분해물이 대부분 산업적으로 이용되고 있으나 단백질을 산으로 가수분해할 경우 tryptophan과 같은 필수 아미노산과 cysteine이 소실되며[7], 알칼리로 분해할 경우는 lysinoalanine[Ne-DL-(2-amino-2-carboxyethyl)-L-lysine]과 같은 독성물질이 생성되어 안전성이 문제가 되고 있다[8].

근년들어 고정화 효소를 이용한 단백질의 연속적 가수분해에 관한 연구가 이루어지고 있으나[9-12], 고정화 방법이 까다롭고 고정화시 입체장애로 인한 효소의 활성저하(10~90%)가 일어난다[13].

그러나 본 연구에서 시도한 효소반응기와 막장치를 조합시킨 재순환 막반응기는 효소를 고정화시키지 않고 순환시켜 재사용할 수 있으며 연속적으로 생성물을 분리하여 분자량이 각각 다른 가수분해물을 생산할 수 있고, 산업적으로 응용할 경우, 제조경비의 절감, 제조시간의 단축, 노동력의 절감, 장치설치면적의 감소 및 자동제어가 가능하다는 점 등 여러가지 장점이 있다.

일반적으로 단백질을 효소로 가수분해시킨 가수분해물은 분해과정에서 생긴 저분자 펩티드와 쓴맛을 내는 아미노산 때문에 쓴맛이 강하여 이용상 제약을 받고 있다[14]. 그러나 젤라틴은 아미노산 조성 중 단맛과 감칠맛을 내는 glycine, proline, hydroxyproline, glutamic acid 등 4종의 아미노산이 전체 아미노산의 약 71%를 차지하고 있다[15].

젤라틴의 가수분해에 관한 연구로 Sattlerlee 등[16]은 소와 돼지피의 가수분해물을 meat emulsion에서 binder로서 이용할 수 있다고 하였고, Monshheimer와 Pfeleiderer[17]는 피혁폐기물을 미생물 protease로 가수분해를 시도하였고, Appleman[18]은 카제인 가수분해물과 젤라틴 가수분해물을 혼합하여 관능적으로나 영양적으로 우수한 음료를 만들 수 있다고 보고하였다. 특히, 젤라틴과 다른 단백질을 동시에 가수분해시켰을 때 맛이 좋아졌다는 여러 보고가 있다[19-21].

본 연구에서는 어피젤라틴을 연속적으로 가수분해시킨 가수분해물을 분자량 크기에 따라 분획하여 기능성 소재로서 이용할 목적으로 재순환식 3단계 막반응기 장치에서의 효소의 활성 및 안정성에 미치는 인자에 대하여 검토하여 젤라틴 가수분해 최적조건을 확립하였다. 아울러 분자량이 서로 다른 펩티드획분의 생산량을 높이기 위한 최적화 공정도 검토하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 재 료

본 실험에서는 전보[22]에서 확립된 최적 추출조건하에서 명태피로부터 젤라틴을 추출하여 열풍건조시킨 후 -10°C 에 저장하여 두고 실험에 사용하였다.

2.2. 젤라틴 분해효소의 선정

어피 젤라틴에 대한 각종 단백질 분해효소의 활성을 비교 검토하기 위해 Hsu 등[23]의 pH-drop법을 이용하였다. 1%(w/v) 젤라틴 용액 50ml씩을 각 효소의 최적 활성을 나타내는 pH 및 온도로 조절한다음, 여기에 효소용액 5ml(4.7mg/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 0.6 l (s.g.=1.25, NOVO Ind., Copenhagen/Denmark Batch No. PMN 0046, 90-9), Neutrase 0.5 l (s.g.=1.25, Novo Ind., Copenhagen/Denmark, Batch No. PMN 0106 88-9), chymotrypsin(51 units/mg solid, Sigma Co., No. P-5147), papin(12 units/mg solid, Sigma Co. No. P-4962), pronase E(4.4 units/mg solid, Sigma Co., NO. P-5147)였으며, 3단계 막반응기에서는 carboxypeptidase로 시도하였으나 거의 활성이 나타나지 않아 예비실험을 통해 collagenase(335 units/mg-solid, Sigma Co., No. C-9891)를 선정하여 실험에 사용하였다.

2.3. 가수분해도 측정

각 단계별 막반응기에서 효소에 의한 기질의 가수분해도는 Adler-Nissen[24]의 방법에 준하여 구하였다. 즉, 각 기질용액을 각 효소의 최적활성을 나타내는 pH 및 온도로 조절한 다음, 동일한 pH로 조절된 효소용액을 가하여 가수분해 반응으로 인하여 소요되는 NaOH량을 측정하여 다음 식으로 계산하였다.

$$\text{가수분해도(\%)} = \frac{B \times N}{\alpha \times MP \times h_{tot}} \times 100$$

여기서 B : NaOH의 소요량(ml)

N : NaOH의 Normal농도

α : α -NH₂기의 평균 해리도=0.085
(50°C, pH 8.0)

MP: 단백질 양

h_{tot} : 단백질의 총 peptide 수
(11.1 meqv/g-protein)

2.4. 회분식에서의 반응속도상수(K_m, V_{max}) 측정

회분식 반응기에서 Alcalase로 어피젤라틴의 가수분해시 반응속도상수는 다음과 같은 방법으로 측정하였다. 즉, 회분식 반응기에 각각 0.05, 0.1, 0.25, 1.0 및 2.0%(w/v)인 어피젤라틴 용액 100ml를 넣고, 50°C로 가열한 다음 0.5N NaOH로 pH 8.0으로 조절하였다. 각각의 어피젤라틴 용액에 효소용액 0.06mg/ml를 가하여 반응시키면서 2분 동안 15초 간격으로 반응혼합물 2ml를 취하여 20%(w/v) 삼염화아세트산(TCA) 용액 2ml가 들어 있는 시험관에 넣고 vortex mixer상에서 1분간 교반한 후, 원심

분리(1,500×g, 10min)하였다. 상층액 2ml를 취하여 질소량을 Lowry 등[25]의 방법으로 측정하여 Km 값과 Vmax값을 계산하였다.

2.5. 연속식 3단계 막반응기를 이용한 어피젤라틴의 가수분해

2.5.1. 연속식 3단계 막반응기 장치

연속식 3단계 막반응기 장치는 Fig. 1과 같이 기질 공급장치, 1단계 막반응기(1st-step membrane reactor, 1st-SMR), 2단계 막반응기(2nd-step membrane reactor, 2nd-SMR) 및 3단계 막반응기(3rd-membrane reactor, 3rd-SMR)장치로 구성되었으며, 기질공급장치를 제외한 각각의 막반응기 장치는 반응기, 중공사막(hollow fiber membrane), 열판교반기(Nuova II, Stir Plate), pH 자동조절기(Cole-Parmer Instrumental Co., Model 5652-20), 유량계(Manostat Co.), 압력조절밸브, 반응혼합물의 순환 펌프(Cole-Parmer Instrumental Co., 6~600rpm) 및 알칼리 공급펌프(Cole-Parmer Instrumental Co., 1~100 rpm)로 구성되었다. 이들 각 장치를 효율적으로 작동하기 위하여 다음과 같이 1단계, 2단계 및 3단계 막반응기의 작동조건을 측정하였다.

2.5.2. 연속식 3단계 막반응기의 작동조건 측정

가. pH 및 온도조절

1단계 및 2단계 막반응기에서 pH와 온도는 pH-drop법으로 선정한 Alcalase 및 pronase E의 최적 조건인 pH 8.0과 온도 50°C로 유지하였다. 반응혼합물의 pH는 pH자동조절기를 이용하여 pH 8.0으로 고정시켜 pH 8.0 이하로 떨어지면 알칼리 공급펌프가 작동되어 1N NaOH가 가해져 pH 8.0±0.1로 조절되고, 온도는 열판교반기로 50±0.5°C로 조절되었으며, 교반속도는 반응기에 자석막대를 넣고 Stirrer No. 5에 고정시켜 반응과정 중 일정하게 유지되도록 조절하였다.

3단계 막반응기에서는 2단계에서 분해된 가수분해물을 collagenase로 가수분해하기 위하여 반응온도 및 pH를 각각 37°C 및 7.5로 조절하였다.

나. 중공사막

1단계 및 2단계 막반응기에 사용된 중공사막은 가수분해물의 분자량이 10,000 이하(1단계) 및

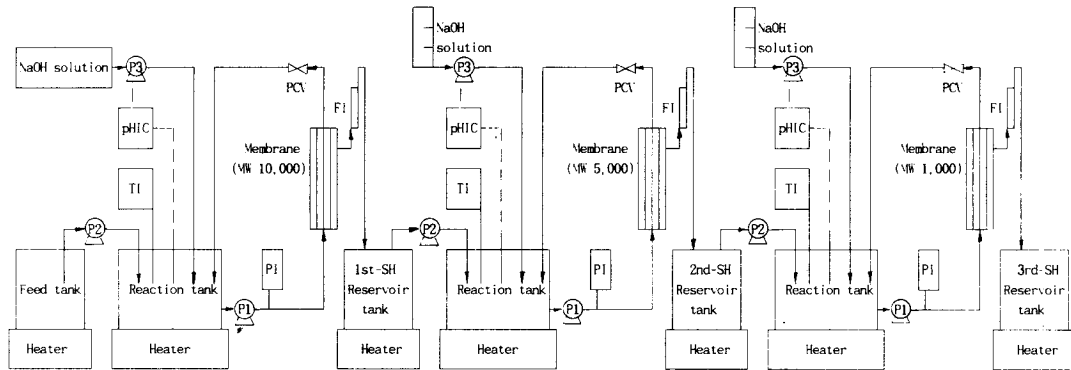


Fig. 1. Schematic of the recycle three-step membrane reactor for the production and separation of enzymatic fish skin gelatin hydrolysates.

TI : Temperature indicator PI : Pressure indicator FI : Flow indicator P1 : Recycling pump

P2 : Feed pump P3 : NaOH pump PCV : Pressure control valve

pHIC : pH indicator controller 1st-SH : 1st-step hydrolysate

2nd-SH : 2nd-step hydrolysate 3rd-SH : 3rd-step hydrolysate

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 사용하였으며, 3단계 막반응기에서는 가수분해물의 분자량이 1,000 이하만 유출되는 1,000 MWCO(Romicon, Model 1.0-43-PM1)를 사용하였다.

다. 유출속도의 조절

각 단계별 막반응기 장치에서 증공사막을 통한 유출속도는 가수분해물이 유출되는 출구에 유량계를 설치하여 측정하였으며, 각 막반응기에 설치한 압력 조절밸브로 유출속도를 조절하였다. 그리고 1단계 막반응기에서 유출속도에 미치는 반응용액의 순환속도의 영향은 반응기에 1%(w/v) 젤라틴 용액 500ml를 넣고, 50℃로 조절한 다음 1N NaOH로 pH 8.0으로 조절하여 검토하였다.

라. 유출속도에 미치는 압력의 영향

1단계 막반응기 장치에 각각 증류수와 1, 2, 4 및 6%(w/v)의 젤라틴 용액 500ml를 넣고, 온도 50℃, pH 8.0로 조절한 다음, 순환속도를 0.86 l/min(Masterflex No.5)로 일정하게 유지시켜 압력변화에 따른 유출속도를 측정하였다. 2단계 및 3단계 막반응기에서도 각각 증류수와 1, 2, 4 및 6%(w/v)의 1단계 및 2단계 가수분해물 용액 500ml를 넣고 1단계

막반응기에서와 동일한 방법으로 압력변화에 따른 유출속도를 측정하였다.

2. 6. 연속식 3단계 막반응기에서의 반응속도상수(Km, Vmax) 측정

1단계 막반응기에서 Alcalase로 어피젤라틴을 가수분해할 때 반응속도상수(Km, Vmax)는 다음과 같은 조건으로 실시하여 측정하였다. 즉, 0.5, 1, 2, 4, 및 6%(w/v)의 젤라틴용액 500ml를 각각 반응기에 넣고, 50℃, pH 8.0으로 조절한 후, 0.1mg/ml의 효소량을 가하여 반응시켰다. 반응혼합물의 순환속도는 0.86 l/min으로 고정시켜 놓고 압력밸브를 이용하여 유출속도를 6.14ml/min으로 조절하였다. 막을 통과한 가수분해물을 10분 간격으로 120분 동안 2ml씩 분취하여 회분식 반응기에서와 같은 방법으로 질소량을 측정한 다음 초기반응속도(mgN/ml/min)를 계산하여 Km, Vmax를 구하였다.

2단계 막반응기 작동에서는 1단계 가수분해물을 pronase E의 기질로 사용하였을 뿐 다른 조건은 1단계 막반응기에서와 동일한 조건과 같은 방법으로 측정하여 반응속도상수를 구하였으며, 3단계 막반응기에서는 collagenase의 기질로 2단계 가수분해물을 사용하였으며, 온도 37℃, pH 7.5로 조절한 후, 반응용액의 부피에 대해 0.1mg/ml 되도록 collagenase를 가하여 1단계와 동일한 조건으로 하여 반응속도상수

를 구하였다.

2. 7. 연속식 3단계 막반응기에서 각 단계별로 최적 가수분해조건 구명

2. 7. 1. 효소농도

1단계 막반응기에서 1% (w/v) 어피젤라틴용액 500ml를 반응기에 넣고, 온도 50°C, pH 8.0(1N NaOH)으로 조절한 후, 여기에 효소농도를 반응부피에 대해 각각 반응부피에 대해 0.02, 0.04, 0.1, 0.2, 0.4, 1.0 및 1.5mg/ml가 되도록 만든 효소용액 5ml를 가한 다음, 유출속도 6.14ml/min에서 가수분해시켰을 때 가수분해 반응으로 인해 소요되는 1N-NaOH 용액의 양을 측정하여 Adler-Nissen[24]의 방법에 따라 가수분해도를 구하였다.

2단계 막반응기에서는 pronase E의 기질로서 1% (w/v)의 1단계 가수분해물을 사용하여 효소농도를 반응부피에 대해 각각 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3 및 0.4mg/ml가 되도록 만든 효소용액 5ml를 가하여 1단계 막반응기에서와 같은 방법으로 가수분해도를 구하였다.

3단계 막반응기에서는 collagenase의 기질로서 1% (w/v)의 2단계 가수분해물을 사용하여 온도 37°C, pH 7.5로 조절한 후, collagenase의 농도를 반응부피에 대해 각각 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3 및 0.4mg/ml가 되도록 가한 후, 1단계 막반응기에서와 같은 방법으로 가수분해도를 계산하였다.

2. 7. 2. 기질농도

1단계 막반응기 장치에서 기질농도의 영향은 다음과 같은 조건으로 측정하였다. 즉, 0.5, 1, 2, 4 및 6% (w/v)의 어피젤라틴용액 500ml를 반응기에 넣고, 50°C로 가열하여, pH 8.0으로 조절한 다음, 각각의 기질용액에 Alcalase의 농도가 반응부피의 0.2mg/ml가 되도록 만든 효소용액 5ml를 가한 후 유출속도 6.14ml/min에서 효소농도에서와 같은 방법으로 하여 가수분해도를 구하였다.

2단계 막반응기에서는 1단계 가수분해물을 상기와 같이 각각의 기질용액에 pronase E의 양이 반응용액의 부피에 대해 0.3mg/ml가 되도록 가하여 1단계에서와 같은 방법으로 가수분해도를 구하였다.

3단계 막반응기에서는 상기와 동일한 농도의 2단계 가수분해물에 collagenase의 양이 반응부피에 대

해 0.1mg/ml가 되도록 만든 효소용액 5ml를 가한 후, 1단계 막반응기에서와 같은 방법으로 가수분해도를 구하였다.

2. 7. 3. 기질대 효소비

1단계 막반응기 장치에서 1% (w/v)의 어피젤라틴용액 500ml를 반응기에 넣고 온도 50°C, pH 8.0으로 조절한 다음, 기질대 효소비가 각각 25, 50, 100, 200, 400, 600 및 1000(w/w)이 되도록 효소량을 가한 후, 유출속도 6.14ml/min에서 효소농도에서와 같은 방법으로 1N-NaOH 용액의 소요량을 측정하여 가수분해도를 계산하였다.

2단계 막반응기장치에서는 pronase E와 기질로써 1단계 가수분해물을 사용한 것외에 1단계 막반응기에서와 같은 방법으로 행하였으며, 3단계 막반응기의 경우도 2단계 가수분해물을 기질로 하여 collagenase로 37°C, pH 7.5에서 반응시킨 것외에 상기와 동일한 방법으로 실시하였다. 상기와 같은 방법으로 반응중 소요되는 0.5N-NaOH 양을 측정하여 가수분해도를 계산하였다.

2. 7. 4. 반응용액의 부피

1단계 막반응기 장치에서의 1% (w/v)의 어피젤라틴용액 400, 600, 800 및 1000ml를 반응기에 넣고 온도 50°C, pH 8.0으로 조절한 다음, 여기에 효소량이 반응부피에 대해 0.2mg/ml(S/E=50, w/w)가 되도록 만든 효소용액 5ml를 가하여 유출속도 6.14ml/min에서 효소농도에서와 같은 방법으로 가수분해도를 구하였다.

2단계 막반응기에서는 1% (w/v)의 1단계 가수분해물 용액에 pronase E의 양이 반응부피에 대해 0.3mg/ml (S/E=33.33, w/w)가 되도록 만든 효소용액 5ml를 가한 후 동일한 방법으로 실시하였으며, 3단계 막반응기에서는 2단계 가수분해물을 상기와 동일한 부피량으로 하여 온도 37°C, pH 7.5로 조절한 다음, 각 기질용액에 대해 collagenase의 양이 반응부피에 대해 0.1mg/ml(S/E=100, w/w)가 되도록 하여 상기와 동일한 방법으로 가수분해도를 구하였다.

2. 7. 5. 유출속도

1단계 막반응기 장치에서 1% (w/v) 어피 젤라틴 용액 600ml를 반응기에 넣고, 50°C, pH 8.0(1N-

NaOH)으로 조절한 다음, 반응부피에 대해 효소량이 0.2mg/ml가 되도록 만든 효소용액 5ml를 가하여, 유출속도를 6.14, 10.0, 19.67 및 23.83ml/min으로 변화시키면서 효소농도에서와 같은 방법으로 가수분해도를 구하였다.

2단계 막반응기의 경우 1%(w/v)의 1단계 가수분해물과 pronase E를 사용하여 상기와 동일한 방법으로 실시하였으며, 3단계 막반응기에서는 1%(w/v)의 2단계 가수분해물과 collagenase를 이용하여 온도 37°C, pH 7.5에서 상기와 같은 방법으로 측정하였다.

2. 8. 연속식 3단계 막반응기에서 각 단계별로 효소의 안정성에 미치는 인자

2. 8. 1. 효소의 누출

막반응기 장치에서 막을 통해서 누출되는 효소의 누출량을 측정하기 위해 각 단계별로 최적 가수분해 조건하에서 행하였다. 1단계 및 2단계 막반응기 장치에서 증류수 600ml를 반응기에 넣고 온도 50°C, pH 8.0으로 조절한 다음, 반응부피에 대해 효소량이 1mg/ml가 되도록 만든 효소용액 5ml를 가한 후, 순환속도 0.86 l/min, 유출속도 6.14ml/min에서 막을 통하여 0누출되는 효소량을 Lowry 법[25]으로 측정하였다. 3단계 막반응기에서는 온도 37°C, pH 7.5로 조절한 후, 순환속도 0.86 l/min, 유출속도 10.0ml/min에서 상기와 같은 방법으로 측정하였다. 이때 각 단계별 막반응기 중의 초기 조작조건상의 정상상태를 유지하기 위하여 각 단계별로 온도 및 pH가 조절된 증류수를 유출속도와 동일한 속도로 일정하게 공급하였다.

2. 8. 2. 반응기의 장치의 기계적인 전단응력 및 막에 의한 영향

막반응기 장치에 의한 효소활성 변화율을 구하기 위한 대조구로써 회분식 반응기에서 실시하였다. 즉, 회분식 반응기에 증류수 600ml를 넣고 온도 50°C, pH 8.0으로 조절한 후 Alcalase의 양이 반응부피에 대해 1mg/ml가 되도록 만든 효소용액 5ml를 가한 후, 반응기로부터 10분 간격으로 1ml를 취하여 미리 온도 50°C, pH 8.0으로 조절된 1%(w/v) 어피 젤라틴용액 4ml와 혼합하여 10분 동안 반응시킨 후 20%(w/v) TCA 용액 5ml를 가하여 TCA가용물에 존재하는 질소량을 측정하여 효소활성을 구하였다.

1단계 막반응기 장치의 작동시 기계적인 전단응력

에 의한 효소활성에 미치는 영향을 측정하기 위하여 증류수 600ml를 반응기에 넣고, 온도 50°C, pH 8.0으로 조절한 다음, Alcalase의 양이 반응부피에 대해 1mg/ml가 되도록 만든 효소용액 5ml를 가한 후, 유출속도 6.14ml/min, 순환속도 0.86 l/min로 작동시키면서 회분식에서와 같은 방법으로 하여 효소활성을 구하였다. 상기와 동일한 조건하에서 막이 효소활성에 미치는 영향을 측정하기 위하여 막을 Tygon tubing으로 교체한 장치에서 효소활성도 구하였다.

2단계 막반응기의 경우, 1단계 막반응기에서와 동일한 조건하에서 pronase E의 양이 반응부피에 대해 1mg/ml이 되도록 만든 효소용액 5ml를 반응기에 넣고, 1단계 막반응기에서와 같은 방법으로 실시하였으며, 동일한 조건하에서 2단계에서 사용한 막이 효소활성에 미치는 영향은 1단계 막반응기에서와 같은 방법으로 하여 효소활성을 구하였다. 3단계 막반응기의 경우는 증류수 600ml를 반응기에 넣고, 온도 37°C, pH 8.0으로 조절한 다음, collagenase의 양이 반응부피에 대해 1mg/ml가 되도록 만든 효소용액 5ml를 가한 후, 유출속도 10ml/min, 순환속도 0.86 l/min에서 작동시키면서 1단계 막반응기에서와 동일한 방법으로 효소활성을 구하였다. 동일한 조건하에서 막이 효소활성에 미치는 영향은 1단계 막반응기에서와 같은 방법으로 하여 효소활성을 구하였다.

효소의 안정성(%) =

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

2. 9. 1단계 막반응기에서 기질농도 한계

1단계 막반응기에서 많은 양의 가수분해물을 얻기 위하여 젤라틴 농도를 높여 상기의 최적조건하에서 가수분해도를 측정하였다. 즉, 5, 10, 15 및 20%(w/v)의 젤라틴용액 600ml를 반응기에 각각 넣고, 온도 50°C, pH 8.0, 순환속도 0.86 l/min, 유출속도 6.14ml/min로 조절하여 기질대 효소비가 50(w/w)이 되도록 효소를 가한 후, 120분 동안 가수분해시 소요되는 1N-NaOH 양을 측정하여 가수분해도를 구하였다. 또한, 2단계 및 3단계 막반응기의 경우는 10%(w/v)의 각 기질용액에 대한 가수분해도를 각각의 최적조건하에서 1단계와 같은 방법으로 구하였다.

2. 10. 연속식 막반응기에서의 생산량 측정

1단계 막반응기 장치에서 어피젤라틴 가수분해물의 생산량은 상기에서 구명된 1단계 막반응기에서의 최적 가수분해조건하에서 측정하였다. 즉, 온도 50℃, pH 8.0으로 조절된 10%(w/v) 어피젤라틴용액 600ml를 반응기에 넣고, 반응부피에 대해 2mg/ml가 되도록 Alcalase를 가한 후, 순환속도 0.86 l/min, 유출속도 6.14ml/min으로 고정시키고, 반응과정 중 반응용액의 부피를 일정하게 유지되도록 10%(w/v) 어피젤라틴용액(50℃, pH 8.0)을 막을 통해 유출되는 가수분해물의 유출속도와 동일한 속도로 반응기에 공급하였다. 가수분해물의 생산량은 막을 통해 유출되는 가수분해물의 질소량을 측정하여 아래 식을 이용하여 계산하였다.

2단계 막반응기 장치의 경우, 1단계 가수분해물을 기질로 하여 1단계에서와 동일한 조건하에서 반응부피에 대해 3mg/ml가 되도록 pronase E를 가한 후, 1단계 막반응기에서와 같은 방법으로 측정하였으며, 3단계 막반응기 장치의 경우는 10%(w/v)의 2단계 가수분해물을 온도 37℃, pH 7.5로 조절하여 collagenase의 양이 반응부피에 대해 1mg/ml가 되도록 만든 효소용액 5ml를 가하여 반응시킨 후 상기와 같은 방법으로 생산량을 측정하였다.

각 단계별 막반응기에서 가수분해물의 생산량은 막을 통해 유출되는 가수분해물의 질소량으로 측정하여 Cheryan과 Deeslie[26]의 방법에 따라 순간 생산량(PI) 또는 누적 생산량(Pc)으로 나타내었다.

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

여기서 P_i : 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)

t : 일정량을 생산하는데 소요되는 시간 (min)

$$P_c = \sum P_i$$

P_c : 시간 변화에 따른 각각 생산량의 합 (mgN/mgE)

3. 결과 및 고찰

3. 1. 효소선정

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%(w/v) 어피젤라틴 용액에 대한 Alcalase, Neutrase, chymotrypsin, papain 및 pronase E의 어피젤라틴 분해활성을 비교한 결과는 Fig. 2와 같이 Alcalase 및 pronase E가 어피젤라틴에 대해 다른 단백질 분해효소보다 pH가 급격히 감소하는 것으로 보아 다른 효소에 비해 어피젤라틴에 대한 가수분해 활성이 높은 것을 알 수 있었다.

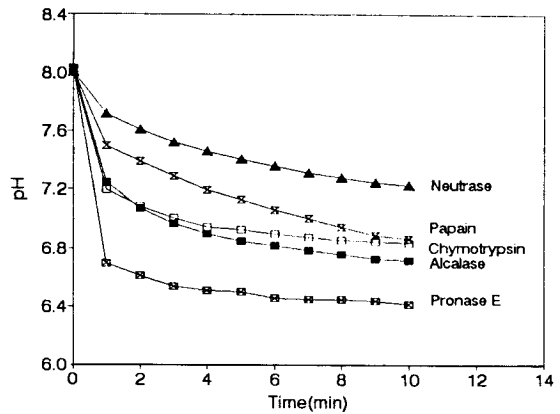


Fig. 2. Comparison of the proteolytic activity of Alcalase, Neutrase, α-chymotrypsin, papain and pronase E on 1% (w/v) fish skin gelatin. Conditions include substrate as fish skin gelatin, S/E=21.3 (w/w), 50℃, pH 8.0.

본 실험에서는 두번째로 활성이 높지만, Alcalase를 1단계 막반응기에서의 어피젤라틴 분해효소로 사용하였으며, 비특이성이 강한 pronase E를 2단계 막반응기에서 가수분해효소로 선정하였다. 그리고 3단계 막반응기에서는 carboxypeptidase로 분해를 시도하였으나 거의 활성이 나타나지 않아 예비실험을 통해 collagenase를 가수분해효소로 택하였다.

3. 2. 연속식 3단계 막반응기의 작동조건

1단계 막반응기에서 가수분해물의 유출속도는 유출구에 유량계를 설치하여 측정하였다. 1단계 막반응기에 pH 8.0, 50℃로 조절된 증류수를 넣고, 막반응기 장치를 작동시켜 유출량 10ml씩을 얻는데 걸리는

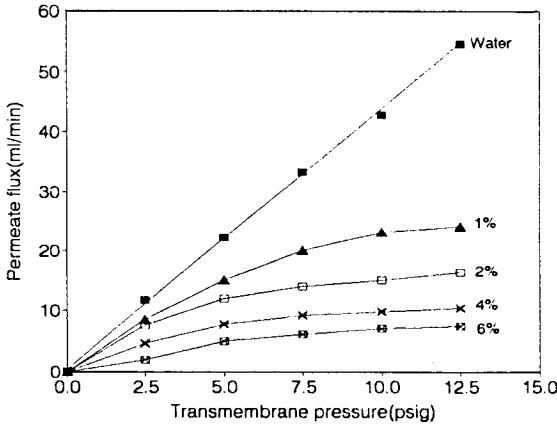


Fig. 3. Effect of transmembrane pressure on permeate flux with fish skin gelatin concentration in the 1st-SMR (pH 8.0, 50°C, Recycling rate 0.86 l/min).

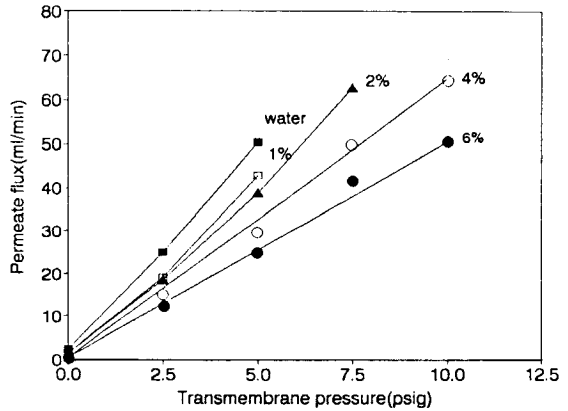


Fig. 5. Effect of transmembrane pressure on permeate flux with 2nd-step hydrolysate concentration in the 3rd-SMR (pH 7.5, 37°C, Recycling rate 0.86 l/min).

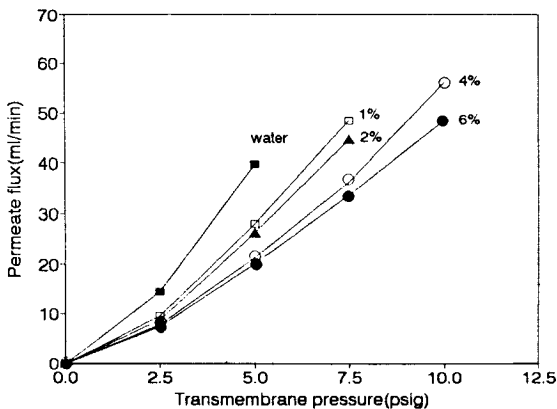


Fig. 4. Effect of transmembrane pressure on permeate flux with 1st-step hydrolysate concentration in the 2nd-SMR (pH 8.0, 50°C, Recycling rate 0.86 l/min).

시간 (min)을 측정하여 유량계의 각 눈금(flowmeter reading)에 대한 유출속도의 회귀직선 방정식을 계산한 결과, 1단계, 2단계 및 3단계 막반응기의 경우 각각 $Y=0.460 \times F-4.033$, $Y=0.437 \times F-2.598$ 및 $Y=0.450 \times F-3.070$ 였다. 각 단계별로 막반응기에 설치된 유량계의 눈금에 따른 유출속도는 각각의 회귀직선 방정식으로 보아 거의 유사하였다. 그리고 1단계 막반응기에서 순환속도에 따른 유출속도는 Masterflex No. 5까지는 유출속도가 거의 비례적으로 증

가하다가 그 이후에는 완만하게 증가하는 경향을 보였다. 따라서 1단계 막반응기에서는 Masterflex No. 5에서 작동하는 것이 가장 효율적이라 판단되었다.

1단계 막반응기에서 유출속도에 미치는 투과압력의 영향은 Fig. 3에 나타난 바와 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 어피젤라틴 용액은 7.5psig 이상에서는 유출속도가 거의 일정하였다. 그러나 2단계 막(MW 5,000 cut off)의 pore size는 1단계 막(MW 10,000 cut-off)에 비해 1/2 정도임에도 불구하고 모든 기질농도에서 투과압력에 따라 유출속도가 높았는데 이 같은 결과는 1단계에서 젤라틴이 상당히 가수분해된 가수분해물을 기질로 사용하였기 때문이라 판단된다(Fig. 4). 3단계의 경우도 2단계의 경우와 유사한 경향을 나타내었으며, 기질농도가 높을수록 유출속도는 감소하는 경향을 보였다(Fig. 5). 이와 같이 1단계 및 2단계에서의 투과유속에 비해 3단계에서 투과유속이 가장 높은 것은 효소에 의한 젤라틴의 저분자화와 이로 인한 점도의 감소에 기인되는 것으로 생각된다. Koutake 등[27]은 단백질 용액의 막에 대한 유출속도의 감소는 막의 pore와 표면에서 단백질의 흡착으로 일어나며, 특히 막의 표면은 용질의 농도에 크게 영향을 받는다고 보고하

였다. Cheryan[28]은 단백질의 농도가 증가하면 점도와 밀도가 높아지므로 투과유출속도가 감소한다고 보고하였으며, Nini[29]은 단백질 용액과 한외여과막과의 상호작용은 단백질용액의 농도, pH, 이온강도 뿐만 아니라 점도, 분산성 및 용해성과 같은 물리적인 성질과 관계있다고 보고하였다. Fox 등[30]은 유청단백질 가수분해물의 기능성을 측정 한 결과, 유청단백질에 비해 모든 pH영역에서 용해도가 증가되었으며, 점도는 감소하였다고 보고한 바 있다.

3. 3. 회분식 및 3단계 막반응기의 Kinetics(Km 및 Vmax)

회분식, 및 각 단계별 막반응기에서의 반응속도상수(Km, Vmax)는 Table 1에 나타내었다. 회분식의 경우, 1%(w/v) 이상의 기질농도에서는 기질저해가 나타났으며, 그보다 낮은 기질농도에서 계산된 Alcalase의 젤라틴에 대한 Km 및 Vmax값은 각각 0.363 mgN/ml(0.203%), 0.544 mgN/ml/min이었다. Bliss와 Hultin[31]은 pronase로 casein의 가수분해시 Km값이 1.67%였다고 보고하였고, Adler-Nessen 등[1]은 Alcalase로 casein의 가수분해시 Km값이 0.11~0.5%였으며, Mannheim[32]은 0.279%였다고 보고하였다. 또한, Svendsen[33]과 Alford 등[34]은 α-chymotrypsin으로 casein의 가수분해시 Km값이 0.1~0.2%였다고 보고하였다.

1단계, 2단계 및 3단계 막반응기에서 반응속도상수는 각 기질농도를 시간변화에 따른 생성량을 측정하여 계산하였다. 이때 각각의 기질농도에 대한 기울기를 측정하여 Lineweaver-Burk plot하여 계산한 결과, 1단계의 경우, 반응속도상수인 Km값 및 Vmax값은 각각 5.510 mgN/ml 및 0.142mgN/ml/min였으며, 2단계의 경우는 4.960mgN/ml 및 0.279mgN/ml/min였다. 3단계에서는 각각 6.542mgN/ml 및 0.131mgN/ml/min였다.

Mannheim[32]은 Km값이 막반응기에서 최적 기질농도의 추정에 이용될 수 있으며, Km값보다 낮은 기질농도에서는 반응속도가 Vmax값보다 매우 낮기 때문에 측매능을 잃게 되고, Km값보다 높은 기질농도에서는 반응혼합물 중의 고형물의 증가를 초래한다고 보고하였다.

회분식에서는 기질저해가 있었지만 각 단계별 연속식 막반응기에서는 기질저해가 나타나지 않았다. 회

Table 1. Kinetic Constants for Batch Reactor and Three-Step Membrane Reactor

Kinetic Constants	Batch Reactor	1st-SMR	2nd-SMR	3rd-SMR
Km(mgN/ml)	0.363	5.510	4.960	6.542
Vmax(mgN/ml/min)	0.544	0.142	0.279	0.131
*Ks(ℓ/min)	56.667	8.875	17.438	8.188
Vmax/Km(ℓ/min)	1.478	0.028	0.056	0.020
R ²	0.988	0.990	0.986	0.992

*K_s=Vmax/E(ℓ/min)

분식에 비해 1단계, 2단계 및 3단계 막반응기에서 Km값은 각각 15배, 13배 및 18배 정도 큰 반면 Vmax값은 4배, 2배 및 4배 정도 낮았다. 이와 같이 회분식에 비해 각 단계별 막반응기에서 효소와 기질의 친화력이 낮게 나타나는 것은 효소의 일부가 누출되었거나 막표면에 효소의 흡착으로 인한 활성저하, 반응혼합물의 순환에 의한 기계적인 전단응력 등 여러 인자에 기인되는 것으로 판단된다.

3. 4. 연속식 3단계 막반응기에서 가수분해 조건

3. 4. 1. 효소농도

연속식 3단계 막반응기에서 각 단계별로 1%(w/v)의 기질용액에 효소농도를 변화시켜 각각의 효소가 작용하여 정상상태에 도달하였을 때의 가수분해도를 측정 한 결과는 Fig. 6과 같다. 1단계 막반응기의 경우, 1%(w/v)의 기질용액에 대해 효소농도가 0.2mg/ml까지는 가수분해도가 급격히 증가하다가 그 이상으로 효소농도가 증가하여도 가수분해도는 3.5%로 거의 일정하였다. 따라서 효소농도는 0.2mg/ml(S/E=50, w/w)가 적합하다고 판단되었다.

2단계 막반응기의 경우, 1%(w/v)의 기질용액에 대해 효소농도 0.3mg/ml까지는 가수분해도가 비례적으로 증가하다가 그 이상의 효소농도에서는 가수분해도가 3.0%로 거의 일정하게 유지되었다. 따라서 2단계 막반응기에서 효소농도는 0.3mg/ml(S/E=33, w/w)로 결정하였다.

3단계 막반응기에서 1%(w/v)의 2단계 가수분해물 용액을 기질로 사용하여 collagenase 농도변화에 따른 가수분해도를 측정 한 결과, collagenase 농도가 0.1mg/ml 이상에서는 가수분해도가 2.6%로 거의 일정하여 3단계에서의 효소농도는 0.1mg/ml로 결정하였다. Bhumiratana 등[35]은 막반응기에서 어육단백질을 효소로 가용화시 0.5mg/ml이 적합하다고 보

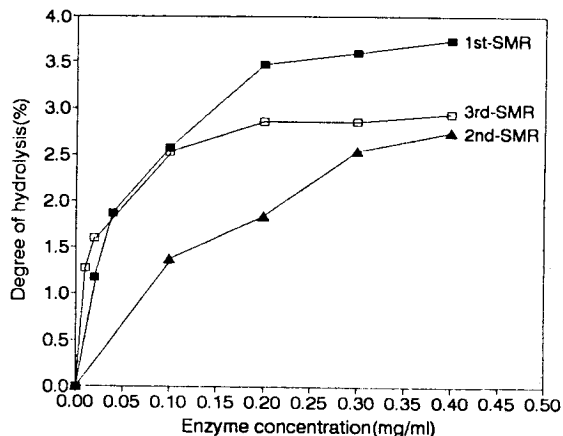


Fig. 6. The effect of enzyme concentration on the degree of hydrolysis in the 1st-SMR, 2nd-SMR and 3rd-SMR.

Conditions: 1st-SMR[S=1%(w/v), pH 8.0, 50°C, Flow rate 6.14ml/min, V=500ml], 2nd-SMR[S=1%(w/v), 50°C, pH 8.0, Flow rate 6.14ml/min, V=500ml], 3rd-SMR[S=1%(w/v), pH 7.5, 37°C, Flow rate 6.14ml/min, V=500ml].

고하였으며, Mannheim과 Cheryan[36]은 casein을 Alcalase로 가수분해시 효소농도가 0.12mg/ml가 적당하였다고 하였다.

3. 4. 2. 기질농도 및 기질대 효소비

연속식 3단계 막반응기에서 각 단계별로 일정한 효소량에 대하여 기질농도에 따른 가수분해도를 측정 한 결과는 Fig. 7과 같다.

1단계의 경우, 1%(w/v) 이하의 기질용액에서는 가수분해도가 3.6% 이상으로 나타났으나, 기질농도가 그 이상으로 증가함에 따라 가수분해도는 다소 감소하는 경향을 보였다. 2단계 막반응기에서도 1단계에 비해 가수분해도가 전체적으로 약간 낮았을 뿐 유사한 경향을 보였다. 그러나 3단계의 경우는 기질농도가 0.5%(w/v)에서는 가수분해도가 4.7%로 매우 높았으나 기질농도가 높을수록 가수분해도는 매우 감소되는 경향을 보였다.

연속식 3단계 막반응기에서 각 단계별로 기질대 효소비(S/E, w/w)의 변화에 따른 가수분해도는 Fig. 8과 같이 1단계의 경우, 기질대 효소비가 증가할수록 가수분해도는 감소하는 경향을 보였으며,

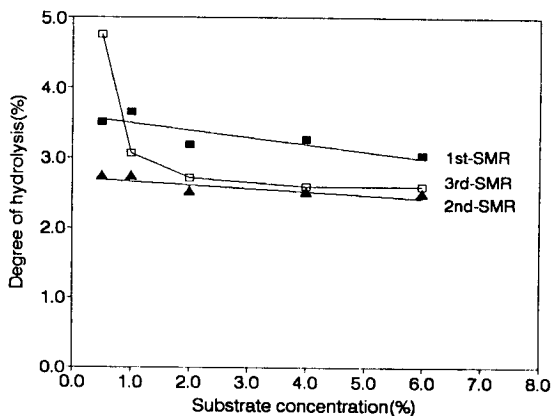


Fig. 7. The effect of substrate concentration on the degree of hydrolysis in the 1st-SMR, 2nd-SMR and 3rd-SMR.

Conditions: 1st-SMR[pH 8.0, 50°C, Flow rate 6.14ml/min, V=500ml], 2nd-SMR[pH 8.0, 50°C, Flow rate 6.14ml/min, V=500ml], 3rd-SMR[pH 7.5, 37°C, Flow rate 6.14ml/min, V=500ml].

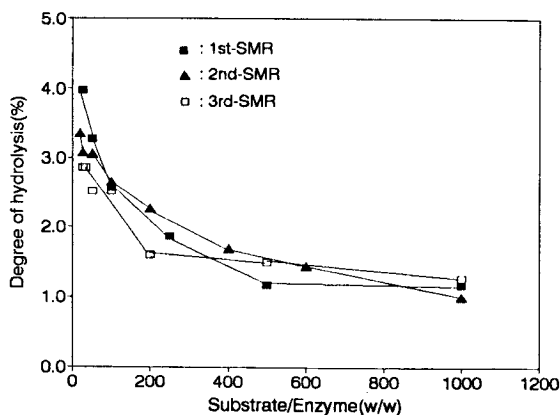


Fig. 8. The effect of substrate to enzyme ratio(w/w) on the degree of hydrolysis in the 1st-SMR, 2nd-SMR and 3rd-SMR.

Conditions: 1st-SMR[S=1%(w/v), pH 8.0, 50°C, Flow rate 6.14ml/min, V=500ml], 2nd-SMR[S=1%(w/v), pH 8.0, 50°C, Flow rate 6.14ml/min, V=500ml], 3rd-SMR[pH7.5, 37°C, Flow rate 6.14ml/min, V=500ml].

1000(w/w)에서 20(w/w)으로 낮아졌을 때 가수분

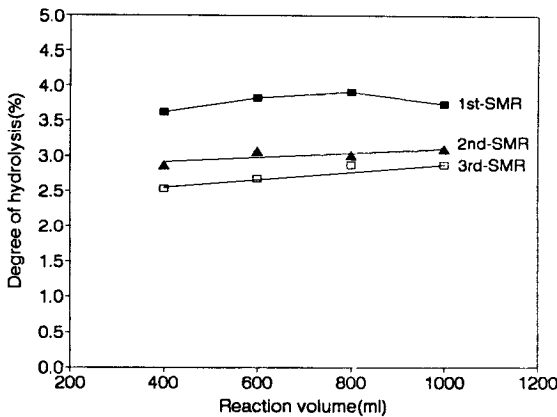


Fig. 9. The effect of reactor volume on the degree of hydrolysis in the 1st-SMR, 2nd-SMR and 3rd-SMR.

Conditions: 1st-SMR[S=1%(w/v), E=0.2mg/ml, pH 8.0, 50°C, Flow rate 6.14ml/min], 2nd-SMR[S=1%(w/v), E=0.3mg/ml, pH 8.0, 50°C, Flow rate 6.14ml/min], 3rd-SMR[S=1%(w/v), E=0.1mg/ml, pH 7.5, 37°C, Flow rate 6.14ml/min].

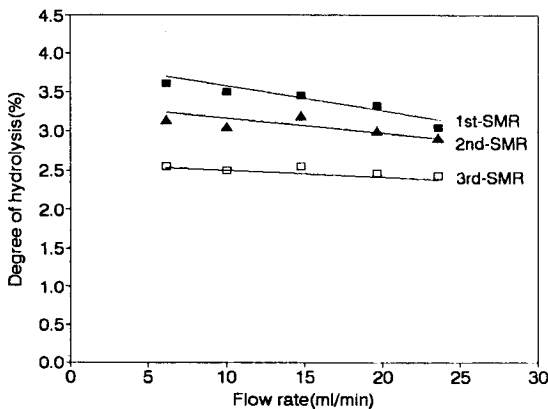


Fig. 10. The effect of flow rate on the degree of hydrolysis in the 1st-SMR, 2nd-SMR and 3rd-SMR.

Conditions: 1st-SMR[S=1%(w/v), E=0.2mg/ml, pH 8.0, 50°C, V=600ml], 2nd-SMR[S=1%(w/v), E=0.3mg/ml, pH 8.0, 50°C, V=600ml], 3rd-SMR [S=1%(w/v), E=0.1mg/ml, pH 7.5, 37°C, V=600ml].

해도는 약 3배 높았으며, 50(w/w)에서의 가수분해도는 3.4%였다. 기질대 효소비가 500(w/w) 이상에서는 가수분해도가 거의 일정하였다. 1단계 막반응기에서 기질대 효소비는 20(w/w)에서 가수분해도가 가장 높았으나 Fig. 6의 결과를 고려하여 기질대 효소비를 50(w/w)으로 결정하였다.

2단계의 경우는 기질대 효소비가 50(w/w)보다 작았을 때 가수분해도는 2.5%이상이었으며, 기질대 효소비가 100(w/w)까지는 가수분해도가 급격히 감소하였으나 그 이상에서는 거의 일정하였다. 2단계 반응에서도 Fig. 6의 결과를 고려하여 기질대 효소비는 33(w/w)으로 결정하였다. 3단계의 경우는 기질대 효소비가 200(w/w)까지는 가수분해도가 감소하였으나 그 이상에서는 거의 일정하였으며, 기질대 효소비가 100(w/w)인 경우 가수분해도는 2.5%로 기질대 효소비가 25(w/w)일 때의 가수분해도 2.8%에 비해 큰 차이가 없었다. Deeslie와 Cheryan[37]은 대두단백질을 pronase로 연속적 가수분해시 최적 E/S비는 1/9과 1/16 사이였다고 보고한 바 있다.

3. 4. 3. 반응부피 및 유출속도

연속식 3단계 막반응기에서 젤라틴 가수분해시 반응액의 부피변화에 따른 가수분해도를 측정된 결과는 Fig. 9와 같다. 각 단계별 막반응기에서 반응부피 400ml 이하에서는 기계적 장치의 제한으로 재순환이 불가능하였으며, 부피가 600ml 이상에서는 가수분해도가 거의 일정하였다. 이러한 반응부피의 영향은 일정한 유출속도에서 효소와 기질이 접촉하여 반응할 수 있는 시간적 차이에 의해 결정되는 것으로 추측된다.

연속식 3단계 막반응기에서 유출속도 변화에 따른 어피젤라틴의 가수분해도를 측정된 결과는 Fig. 10과 같다. 유출속도가 증가할수록 정상상태에 도달하는 시간은 빨랐지만, 가수분해도는 약간 감소하는 경향을 보였다. 이 결과는 반응부피의 영향과 동일한 원인으로 빠른 유출속도로 인해 반응기 내에서 기질과 효소가 작용할 시간이 감소되기 때문이라고 생각된다. 따라서, 본 실험에서는 유출속도를 가수분해도가 3.6%인 6.14ml/min으로 정하였다. 2단계 및 3단계의 막반응기의 경우도 1단계의 결과와 비슷한 경향을 나타내었으나, 가수분해도는 전체적으로 3단계가 가장 낮았으며, 3단계에서의 유출속도는 10ml/min으로 조절하였다.

3. 5. 각 단계별 막반응기에서 효소의 안정성에 미치는 인자

3. 5. 1. 효소의 누출

연속식 3단계 막반응기의 각 단계별로 최적 가수분해조건 하에서 막을 통해 누출되는 효소량을 측정한 결과는 Fig. 11과 같다. 1단계 막반응기의 경우, 작동시간 20분에서 0.174 mg/ml로 가장 많이 누출되었으며, 그 이후 3시간까지 급격히 감소하다가 6시간에는 거의 누출되지 않았다. 이때의 전체 효소 누출량은 18.53%였다.

2단계 막반응기의 경우, 막반응기 작동시간 10분에서 0.131mg/ml로 가장 많이 누출되었으나, 그 이후 2시간까지 급격히 감소하다가 4시간 이후에는 거의 누출되지 않았다. 이때의 전체 효소누출량은 12.54%였다. 2단계 막반응기에서 효소의 누출은 1단계 막반응기에 비해 막의 pore size의 크기가 배로 작기 때문에 효소의 누출량이 적은 것으로 판단되었다. 3단계 막반응기의 경우는 작동시간 20분에서 0.047mg/ml로 효소누출량이 가장 많았으며, 2단계 막반응기에서와 같이 2시간까지 급격히 감소하다가 그 이후 완만하게 감소하여 8시간 이후에는 누출되지 않았다. 이때 전체 효소누출량은 5.90%였다.

Mannheim[32]은 막반응기를 이용하여 Alcalase로 casein을 가수분해시 효소의 누출량을 측정한 결과, 온도 37°C, 50°C에서 각각 효소의 누출량은 57%, 52%였으며, 반응기 조작 90분 이내의 유출용액에서만 단백질 분해활성을 측정할 수 있었다고 하였으며, 초기단계에서 누출된 효소는 잔류효소의 활성에 크게 영향을 미치지 않는다고 보고하였고, 김 등[38]도 효소누출과 반응기 안정성간에는 직접적인 상호관계는 나타나지 않아 초기단계에서 누출된 효소는 잔류효소의 활성에 크게 영향을 미치지 않는다고 보고한 바 있다.

3. 5. 2. 막반응기 장치 및 막에 의한 영향

연속식 3단계 막반응기에서 각 단계별 막반응기로 효소의 활성에 대한 기계적인 전단응력 및 막에 의한 영향을 알아보기 위해 초기 활성을 측정한 결과는 Table 2와 같다.

1단계 막반응기의 경우, 회분식 반응기에 비해 연속식인 1단계 막반응기에서 기계적인 전단응력에 의한 영향은 막반응기 작동시간 1시간까지 효소활성이

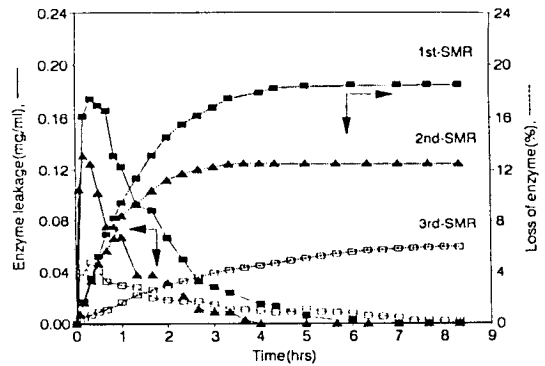


Fig. 11. The leakage of enzyme in the 1st-SMR, 2nd-SMR and 3rd-SMR.

Conditions: 1st-SMR[E=1mg/ml, pH 8.0, 50°C, Flow rate 6.14ml/min, V=600ml, Recycling rate 0.86 l/min], 2nd-SMR[E=1mg/ml, pH 8.0, 50°C, Flow rate 6.14ml/min, V=600ml, Recycling rate 0.86 l/min], 3rd-SMR[E=1mg/ml, pH 7.5, 37°C, Flow rate 10ml/min, V=600ml, Recycling rate 0.86 l/min].

30% 감소하였으며, 그 이후는 효소활성이 완만하게 감소하여 3시간 작동하였을 때의 효소활성은 초기활성의 34%가 저하하였다. 기계적인 전단응력과 막반응기의 영향 중에서 막에 의한 영향만을 정확하게 측정하기 위해 막 대신에 Tygon tube로 대체시킨 장치를 대조구로 사용한 결과, 작동시간 1시간까지 Alcalase의 활성이 15% 감소하였으며, 반응시간이 길어짐에 따라 서서히 감소되어 반응시간 3시간에서 24%의 활성저하를 나타내었다.

2단계 막반응기의 경우는 회분식 반응기에 비해 기계적인 전단응력의 영향은 작동시간 1시간까지 효소활성이 14%로 감소하였으며, 그 이후는 매우 완만하게 감소하였다. 막을 제거한 반응기에서 pronase E의 활성은 작동시간 1시간까지 9%가 저하하였으나 그 이후에는 거의 활성 저하가 나타나지 않았다.

3단계 막반응기의 경우도 회분식 반응기에서는 막반응기 작동시 효소의 활성이 약간 감소하였지만, 막반응기 장치의 기계적인 전단응력에 의한 효소활성은 작동시간 1시간까지 18% 감소하였으나, 그 이후로

Table 2. The Effect of the Batch, 1st-step, 2nd-step and 3rd-step Membrane and Mechanical Shear Rate on Enzyme Stability

Time(min)	1st-SMR			2nd-SMR			3rd-SMR		
	Batch Reactor	None Membrane	Membrane	Batch Reactor	None Membrane	Membrane	Batch Reactor	None Membrane	Membrane
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
10	97	93	95	98	98	93	98	98	92
20	95	92	84	98	97	90	98	96	89
40	93	90	78	98	92	88	98	91	83
60	94	85	70	97	91	86	97	90	82
90	90	80	67	97	89	86	97	88	81
120	89	79	65	97	89	85	97	87	78
150	88	76	64	96	89	85	97	86	78
180	87	76	63	96	89	85	96	86	76

(%)

는 완만하게 감소되어 3시간 동안 초기활성의 24%가 감소하였다. 그리고 막을 제거하였을 때 작동시간 1시간 동안 10%가 감소되었으며 그 이후는 완만하게 감소하였다. 이와 같이 중공사막에 의한 효소활성 감소는 막이 효소를 흡착하거나 활성부위에 영향을 미치는 것으로 판단된다. 효소활성에 대한 막의 영향에 대하여 Cheryan[39]은 10% 정도 효소안정성간에 차이가 있었다고 보고하였고, Mannheim과 Cheryan[36]은 한외여과막 반응기에서 Alcalase의 활성에 미치는 막의 영향을 측정된 결과, 막이 있을 때 60분에서 초기활성의 85%가 손실되었으며, 막을 제거시켰을 때는 30% 효소활성이 감소되었다고 보고하였는데 본 실험결과에서는 이에 비해 막에 의한 효소활성의 저하가 낮은 편이었다.

3. 6. 고 기질농도의 한계

1단계 막반응기에서 Alcalase의 최적가수분해 조건인 pH 8.0, 온도 50°C, 유출속도, 6.14ml/min, 부피 600ml, S/E=50(w/w)에서 기질농도를 5, 10, 15 및 20%로 변화시켜 가수분해도를 측정된 결과는 Fig. 12와 같다. 기질농도가 10%(w/v)에서는 반응시간 40분까지 가수분해도는 3.4%로 증가하였으며, 2시간 반응시킨 후 가수분해도는 3.8%였다. 기질농도 15 및 20%에서는 반응시간 40분까지 가수분해도가 2.8%로 증가하였지만, 그 이후의 가수분해도는 거의 일정하였다. Penny 등[40]은 저분자 펩타이드를 단백질 가수분해효소(α -chymotrypsin)로 분해한 경우, 기질농도가 7.5% 이상에서 역합성이 이루어진다고 하였으며, 특히 기질농도가 20~40%에서 역합

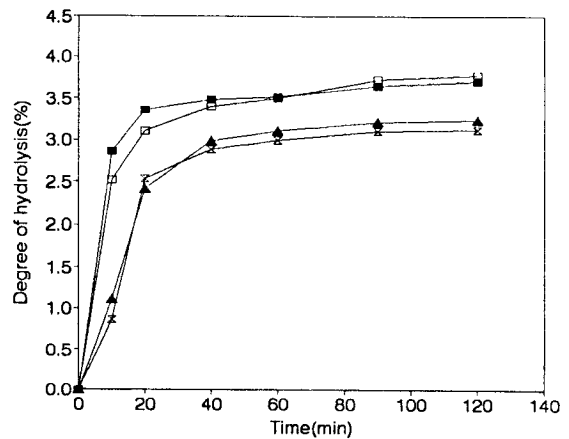


Fig. 12. Comparison of the degree of hydrolysis with substrate concentration in the 1st-SMR 5% [■], 10% [□], 15% [▲], 20% [X] (S/E=50(w/w), pH8.0, 50°C, Flow rate 6.14ml/min, V=600ml).

성의 수율이 가장 높았다고 보고한 바 있다. 본 연구에서 기질농도가 15% 이상에서는 가수분해도가 감소한 결과를 보였는데 이것은 가수분해물이 오히려 단백질 가수분해효소에 의한 역합성으로 인해 고분자 펩타이드로 합성되었기 때문이라 판단된다.

연속적으로 3단계 가수분해가 가능한지를 알아보기 위해 1단계의 최적 가수분해조건하에서 최적 고기질 농도인 10%(w/v)의 결과를 2단계 및 3단계의 최적 조건하에서도 시간변화에 따라 가수분해도를 측정하여 비교한 결과는 Fig. 13과 같다. 1단계, 2단계 및 3단계 반응기에서의 10%(w/v) 기질용액의 가수

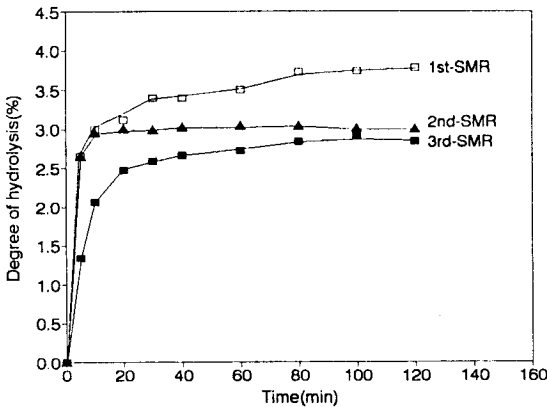


Fig. 13. Comparison of the degree of hydrolysis on 10% (w/v) substrate concentration in the 1st-SMR, 2nd-SMR and 3rd-SMR at optimum conditions, respectively.

Optimum conditions: 1st-SMR [pH 8.0, 50 °C, E=2mg/ml, V=600ml, Flow rate 6.14ml/min], 2nd-SMR [pH 8.0, 50 °C, E=3mg/ml, V=600ml, Flow rate 6.14ml/min], 3rd-SMR [pH 7.5, 37 °C, E=1mg/ml, V=600ml, Flow rate 10ml/min].

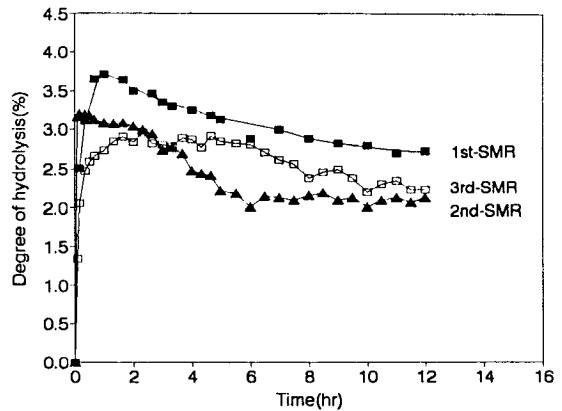


Fig. 14. Long-term operating stability of 1st-SMR, 2nd-SMR and 3rd-SMR for enzyme-substrate hydrolysis optimum conditions, respectively.

Conditions: 1st-SMR [S=10% (w/v), pH 8.0, 50 °C, E=2mg/ml, Flow rate 6.14ml/min], 2nd-SMR [S=10% (w/v), pH 8.0, 50 °C, E=3mg/ml, Flow rate 6.14ml/min], 3rd-SMR [S=10% (w/v), E=1mg/ml, Flow rate 10ml/min].

분해도는 1단계, 2단계, 3단계 순으로 가수분해도가 낮은 것으로 보아 기질공급에 문제가 없으므로 연속적으로 3단계 분해가 가능함을 알 수 있었다. 일반적으로 효소에 의한 단백질의 가수분해시 기질농도는 1~5% 범위로 보고[32]되어 있는 것에 비해 본 연구에서의 기질농도 10%는 매우 높은 기질농도임을 알 수 있었다.

3. 7. 연속식 3단계 막반응기 시스템의 장시간 작동시 안정성

막반응기 장치를 장시간 작동할 때의 안정성을 측정하기 위하여 각 단계별 최적 조건하에서 시간변화에 따른 기질의 가수분해도를 측정된 결과는 Fig. 14와 같다.

1단계 막반응기의 경우, 막반응기 작동시간 2시간 이내에 가수분해도가 3.7%로 가장 높았으며, 그 이후는 반응시간이 길어질수록 가수분해도는 다소 떨어지는 경향을 나타내었다. 12시간 작동시켰을 때 기질의 가수분해도는 2.8%였으며, 이것은 시간당 평균 가수분해도의 감소로는 0.9%였다.

2단계 막반응기의 경우는 작동시간 4시간까지 가수분해도가 약간 감소하는 경향을 보였으며, 그 이후에는 거의 일정하였다. 이 같은 결과는 Fig. 11의 효소누출량의 결과와 관계가 있는 것으로 생각된다. 또한, 3단계 막반응기에서는 작동시간 5시간까지 가수분해도는 거의 일정하였으나, 그 이후에는 다소 감소 경향을 보였다. 1단계 및 2단계에 비해 3단계가 효소의 안정성이 다소 높은 결과를 나타내었는데 이것은 Fig. 11에 나타난 효소의 누출량이 1단계 및 2단계에 비해 적은 결과와 일치하였다.

3. 8. 가수분해물의 생산량

최적가수분해 공정조건하에서 회분식과 각 단계별 막반응기에서 부피대체율에 대한 가수분해물의 생산량을 측정된 결과는 Fig. 15와 같다. 1단계에서 가수분해물의 생산량은 부피대체율 5배까지는 생산량이 비례적으로 증가하였지만, 그 이후로는 생산량이 완만하게 증가하는 경향을 나타내었다. 이와 같이 부피대체율이 증가함에 따라 생성량이 완만하게 증가하는 것은 반응기 내에서 효소의 누출, 막반응기에 의한

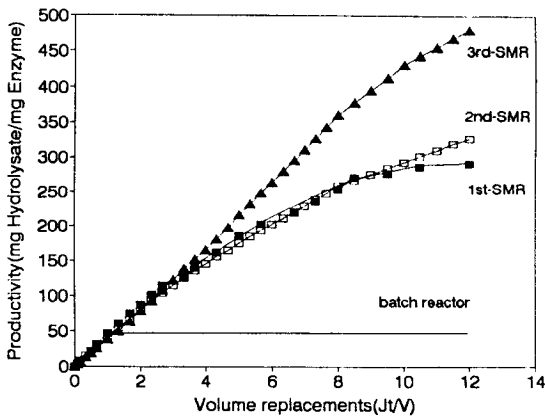


Fig. 15. Comparison of the productivities of hydrolysate with the batch reactor, 1st-SMR, 2nd-SMR and 3rd-SMR.

Conditions: 1st-SMR[S=10% (w/w), E=2mg/ml, S/E=50 (w/w), pH 8.0, 50°C, Flow rate 6.14ml/min, V=600ml], 2nd-SMR[S=10% (w/v), E=3mg/ml, S/E=33 (w/w), pH 8.0, 50°C, Flow rate 6.14ml/min, V=600ml], 3rd-SMR[S=10% (w/v), E=1mg/ml, pH 7.5, 37°C, Flow rate 10ml/min, V=600ml].

기계적인 전단응력, 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 41mg이었다. 이에 비해 1단계 막반응기에서의 생산량은 185mg으로 회분식의 생산량에 비해 4.5배 이상 높았다. 회분식에서는 각각 부피변화에 대한 같은 양의 효소와 기질이 필요하다. 1단계 막반응기는 기질에 대한 효소의 친화력이 회분식에 비해 낮았지만, 효소를 재순환시켜 사용함으로써 효소당 생산량은 회분식에 비해 매우 높았다.

2단계 막반응기의 경우는 부피대체율이 8배까지 생산량이 비례적으로 증가하였으며, 이때의 생산량은 효소 mg당 272mg이었다. 1단계 막반응기에서 부피대체율이 5배까지 생성량은 비례적으로 증가하였으며 이때의 생산량은 185mg이었지만, 2단계 막반응

기는 8배까지 비례하는 것으로 보아 효소 mg당 생산량이 약 1.5배 증가하였다. 이같은 결과는 2단계 막반응기에서 1단계 가수분해물을 이용함으로써 가수분해물 중에 포함된 5,000 이하의 peptide가 포함되어 있기 때문이라 생각된다.

3단계 막반응기에서 가수분해물의 생산량은 부피대체율 10배까지는 생산량이 비례적이었으며, 효소 mg당 가수분해물의 생산량은 430mg이었다. 이와 같이 각 단계별 막반응기에서 부피대체율이 증가됨에 따라 생산량이 다소 감소되는 것은 반응기 내에서의 효소활성저하에 기인되는 것으로 생각된다. 기질에 대한 효소의 친화도는 회분식이 1단계 막반응기에 비해 높지만, 생산량은 막반응기에서 효소의 재순환으로 인하여 회분식보다 매우 높았다. 3단계 막반응기에서의 가수분해도는 1단계 및 2단계 막반응기에서 보다 낮았지만 효소 mg당 가수분해물의 생산량은 오히려 430mg으로 높았다. 이같은 결과는 3단계에서 사용한 중공사막의 표면적이 1단계 및 2단계의 막보다 넓은 데도 그 원인이 있을 것으로 보인다.

4. 결 론

어피로부터 추출한 젤라틴을 효소로 가수분해시킨 가수분해물을 분자량 크기에 따라 분획하여 이를 기능성 소재로서 이용할 목적으로 연속식 3단계 막(1st-SMR, MWCO 10,000; 2nd-SMR, MWCO 5,000; 3rd-SMR, MWCO 1,000)반응기 장치를 이용하여 젤라틴 가수분해를 위한 최적 가수분해 조건이 구명되었고, 또한 막반응기 장치를 장시간 작동하였을 때, 기계적인 응력 및 막에 의한 효소활성 및 안정성에 미치는 인자에 대하여 검토하였으며, 아울러 분자량이 서로 다른 가수분해물 회분의 생산량을 높이기 위한 최적화 공정도 검토하였다.

1. pH-drop법으로 측정된 젤라틴에 대한 가수분해 효소의 활성은 pronase E가 가장 높았고, 다음이 Alcalase였다. 그리고 2단계 가수분해물을 carboxypeptidase로 분해를 시도하였으나 거의 활성이 나타나지 않았지만, collagenase는 활성이 나타났다.

2. 젤라틴에 대한 Alcalase의 반응속도 상수인 Km 값과 Vmax값은 회분식에서 각각 0.363mgN/ml 및 0.544mgN/ml/min였으나, 연속식(1단계)에서는 이들의 값이 각각 5.510mgN/ml, 0.142mgN/ml/min였다. 2단계 및 3단계의 경우 Km 및 Vmax값은 각

각 4.960mgN/ml, 0.279mgN/ml/min 및 6.542mgN/ml, 0.131mgN/ml/min였다. 이와 같이 Km값으로 보면 기질과 효소와의 친화력은 회분식에 비해 연속식에서 떨어지지만, 연속식에서는 효소를 순환시켜 재사용함으로써 효소 mg당 가수분해물의 생산량을 높일 수 있었다.

3. 연속식 3단계 막반응기 장치에서 각 단계별 막반응기의 최적 가수분해조건은 1단계는 반응온도 50°C, pH 8.0, Alcalase농도 0.2mg/ml, 기질대 효소비 50(w/w), 반응부피 600ml, 유출속도가 6.14ml/min에서 잔류시간은 98분이었으며, 2단계의 경우, protease E의 농도 0.3mg/ml, 기질대 효소비 33(w/w)였으며, 그 이외의 조건은 1단계와 동일하였다. 그리고 3단계 막반응기에서는 반응온도 37°C, pH 7.5, collagenase농도 0.1mg/ml, 기질대 효소비 100(w/w), 유출속도 10ml/min에서 잔류시간은 60분이었다.

4. 3단계 막 반응기 장치를 장시간 동안 작동하였을 때 막을 통한 효소의 누출량은 1단계가 전체 효소량 중 누출된 효소량은 작동시간 5시간에서 18.53%로 가장 많았고, 다음이 2단계로 작동시간 4시간에서 12.54%였으며, 3단계의 경우, 작동시간 8시간에서 5.90%로 가장 누출량이 적었다.

5. 3단계 막반응기 장치에서 기계적인 전단응력에 의한 효소활성 저해는 1단계의 경우, 작동시간 1시간까지 30% 감소되었으며, 그 이후에는 효소활성의 감소는 거의 일어나지 않았다. 이때 막에 의한 효소활성 감소는 15%였다. 2단계 및 3단계 막의 경우, 기계적인 전단응력 및 막에 의한 효소활성은 각각 14%, 5% 및 18%, 8%였다.

6. 가수분해물의 생산량은 회분식에서 효소 mg당 41mg였으나 연속식(1단계) 막반응기 장치에서는 부피대체율 5배까지 생산량이 증가하여 mg당 185mg로 회분식에 비해 약 4.5배 이상 생산량이 많았다. 2단계 및 3단계 반응기의 경우 부피대체율이 각각 8배, 10배까지 생산량이 비례적으로 증가하여 효소 mg당 생산량은 각각 272mg, 430mg로 3단계가 가장 높았는데 이것은 사용한 막의 표면적이 1단계 및 2단계 보다 컸기 때문이라 생각된다.

감 사

본 연구는 과학기술처에서 시행한 특정연구개발사업과제 수행에 의한 연구결과이며, 연구비를 지원해

준 과학기술처에 감사드립니다.

참고문헌

1. J. Adler-Nissen, "Protein Tailoring and Reagents for Food and Medical Uses", Ed, R. E. Feeney, J. R. Whitaker, 97, Marcel Dekker Inc., New York(1986).
2. J. H. Ernster, U. S. Patent 4,600,588(1986).
3. J. E. Kinsella and D. M. Whitehead, "Milk-the Vital Force", D. Reidel Pub. Co., 791, Ithaca New York, (1987).
4. S. L. Turgeon, S. F. Gauthier, and P. Paquin, *J. Agric. Food Sci.*, **39**, 673(1991).
5. H. Otani, K. Takayama, and F. Tokita, *Hilchwis-senschaft*, **41**, 565(1985).
6. R. Jost, J. C. Monti, and J. J. Pahud, *Food Technol.*, **41**, 118(1988).
7. J. E. Kinsella, *J. Am. Oil. Chemists' Soc.*, **56**, 242 (1979).
8. Q. Y. Deng, R. R. Barefoot, L. L. Divsady, L. J. Rwbins, and Y. M. Tzeng, *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, **23**, 440(1990).
9. J. R. Lash, R. Koelsch, and K. Kretschmer, *Acta Biotechnol.*, **7**, 227(1987).
10. J. F. Kennedy, E. H. Melo, and K. Jumel, *Chem. Eng. Prog.*, **86**, 81(1990).
11. G. S. Sakai, N. Yamamoto, S. Yoshida, K. Mikuni, H. Ishigami, and K. Hara, *Agric. Biol. Chem. (Tokyo)*, **55**, 45(1991).
12. F. X. Malcata, C. G. Hill, and C. H. Amundson, *Biotechnol. Bioeng.*, **39**, 984(1992).
13. M. Cheryan and M. A. Mehaia, "Membrane Bioreactor in Membrane Separations in Biotechnology", W. C. Megregor, 255, Marcel Dekker, Inc, New York (1986).
14. 김세권, 이용호, *한국수산학회지*, **20**, 282(1987).
15. 김세권, 이용호, 강옥주, 권철성, *냉조공조공학*, **5**, 5(1986).
16. L. D. Sattlerlee, N. Y. Zachariah, and E. Levin, *J. Food Sci.*, **38**, 268(1973).
17. R. Monsheimer and E. Pfeleiderer, U. S. Patent, 4,293,647(1981).

18. M. L. Appleman, Br. Patent, 1,308,690(1973).
19. K. Schwille, H. Seiz, E. Sorg, and U. Sommer, Br. Patent, 1,483,953(1977).
20. K. H. Ney, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **56**, 295 (1979).
21. D. W. Stanley, *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, **14**, 49(1981).
22. 김세권, 변희국, 이응호, *공업화학회지*, **5**, 547 (1994).
23. H. W. Hsu, D. L. Vavak, L. D. Satterer, and G. A. Miller, *J. Food Sci.*, **42**, 1269(1977).
24. J. Adler-Nissen, "Enzymatic Hydrolysis of Proteins", 122, Elsevier, London (1986).
25. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265(1951).
26. M. Cheryan and W. D. Deeslie, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **60**, 1112(1983).
27. M. Koutake, I. Matsuno, H. Nabetani, M. Nakajima, and A. Watanabe, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 697(1992).
28. M. Cheryan, *J. Food Eng.*, **1**, 269(1977).
29. M. Nini, Ultrafiltration of Proteins-Theory and Application, Thesis of Degree Doctor, London (1979)
30. P. F. Fox, P. A. Morrissey, and D. M. Mulvihill, "Developments in Food Proteins", Ed. B. J. F. Hudson, Applied Science Publishers, London (1982).
31. F. M. Bliss and H. O. Hultin, *J. Food Sci.*, **42**, 425(1977).
32. A. Mannheim, Continuous hydrolysis of milk protein in a membrane reactor Master's Thesis, Dept. of Food. Sci. University of Illinois. Urbana-Champaign(1988).
33. I. Sevendsen, *A Review Carlsberg Res. Commun.*, **41**, 237(1976).
34. E. S. Alford, V. Piriyanpan, C. W. Dill, C. R. Young, R. L. Richter, and W. A. Landmann, *J. Food Sci.*, **49**, 614(1984).
35. S. Bhumiratana, C. G. Hill, and C. H. Amundson, *J. Food Sci.*, **42**, 1016(1977).
36. A. Mannheim and M. Cheryan, *J. Food Sci.*, **55**, 381(1990).
37. W. D. Deeslie and M. Cheryan, *J. Food Sci.*, **46**, 1035(1980).
38. 김세권, 변희국, M. Cheryan, *한국생물공학회지*, **6**, 309(1991).
39. M. Cheryan, "Ultrafiltration Handbook", Technomic Publishing Co. Inc. Lancaster, Basel. (1986).
40. I. F. Penny, C. A. Voyle, and E. Dransfield, *J. Sci. Agric.*, **25**, 703(1974)