

Hydrolysis of Egg Yolk Protein in a Packed Bed Reactor by Immobilized Enzyme

Byung Chul Kang*

Department of Chemical Engineering, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea

Received August 18, 2010 / Accepted November 11, 2010

Alkaline protease for the hydrolysis of egg yolk protein was immobilized on five carriers - Duolite A568, Celite R640, Dowex-1, Dowex 50W and Silica gel R60. Duolite A568 showed a maximum immobilization yield of 24.7%. Optimum pH for the free and immobilized enzyme was pH 8 and 9, respectively. However, no change was observed in optimum temperature (50°C). Thermal stability was observed in immobilized enzymes compared to free enzymes. The immobilized enzyme retained 86% activity after 10 cycle operations in a repeated batch process. The effect of flow rate on the stability of enzyme activity in continuous packed-bed reactor was investigated. Lowering flow rate increased the stability of the immobilized enzyme. After 96 hr of continuous operation in a packed-bed reactor, the immobilized enzyme retained 83 and 61% activity when casein and egg yolk were used as a raw materials, respectively.

Key words : Enzyme immobilization, egg yolk protein, packed-bed reactor, continuous operation, repeated batch

서 론

식품가공 산업에 널리 사용되고 있는 계란은 난백이 주로 사용되고 있고 난황을 가공하는 수요는 적은 실정이다. 난황은 수분을 제외하고 지질과 단백질로 구성되어 있다[11]. 난황 단백질의 가수분해에 의해 추출된 시알산올리고당(sialyloligosaccharide)은 항 염증 작용, 바이러스 감염의 예방 및 학습기능의 향상시키는 작용이 있어 의약품 및 기능성 식품의 소재로 연구되고 있다[8,16]. 효소를 이용한 난황 단백질 가수분해 공정은 회분식으로 인해 생산성의 감소와 효소를 재사용할 수 없는 단점이 있다. 회분식 공정의 단점을 극복하기 위한 효소 고정화에 의한 연속공정은 개발되어있지 않은 상태이다.

고정화 효소를 이용한 식품, 제약 그리고 생명 분야의 제품 생산에 대한 많은 연구가 진행되어 왔다[5]. Alkaline protease를 담체에 고정화 시키는 방법도 일반적인 효소의 경우와 같은데 고정화 효소는 불용성 물질에 효소를 흡착하는 방법[3,23], 젤 상태의 물질에 효소를 가두는 방법[9,17,21], 고분자의 상태에 따라 sol/gel상태로 고정화 방법[21,22], 이중의 작용기를 갖는 시약에 상호 가교하는 방법[2], 그리고 불용성 담체에 효소를 공유 결합 하는 방법[10,15,18] 등이 있다. 일반적으로 상업적인 반응기는 용해 효소를 직접 사용하여 혼합 반응기에서 회분식으로 운전되는 것으로 알려져 있다. 하지만 생산성이 낮은 회분식 공정보다 생산성 및 운전 안정성을 향상시키기 위한 고정화 효소를 이용한 연속식 공정의 개발이

널리 진행되어 왔다[4,6,13]. 고정화 효소를 이용한 연속식 공정은 제품의 회수를 용이하게 하여 분리 정제비용을 감소시킬 수 있고, 고정화에 의해 효소 촉매가 반응하는 좋은 환경을 제공할 수 있고, 그리고 효소를 계속적으로 재사용할 수 있는 여러 가지 장점이 있다. 유기물 또는 무기물 담체를 이용하여 단백질 가수분해 효소의 고정화에 대한 연구가 진행되었지만 다른 효소에 비해 많은 연구가 진행되지는 않았다.

본 연구는 난황 단백질의 가수분해를 위한 연속공정을 개발하기 위해 효소를 여러 가지 담체에 고정화하여 그 특성을 조사하여 최적의 담체를 선별하고자 하였다. 고정화 효소에 대한 최적의 조건을 위한 pH, 온도, 그리고 열 안정성을 평가하였다. 충전층 반응기를 사용하여 연속식 운전을 실시하여 공정 변수들에 대한 적절한 조업조건을 평가하고 연속운전에서 장시간 조업을 통한 고정화 효소의 안정성을 평가하였다.

재료 및 방법

효소 및 시약

단백질 가수분해 효소는 alkaline protease인 Orientase BF-22 (EC 3.4.21.62; Hankyu Bio-industry, Osaka, Japan)를 사용하였다. 효소 고정화를 위해 5가지의 담체는 무기 담체인 Celite R640과 Silica gel 60은 Fluka에서 구입하였고, 이온교환수지로 사용되는 유기 담체인 Duolite A568는 Rohm and Haas에서, 그리고 Dowex W50과 Dowex 1은 Sigma에서 구입하여 사용하였다. 난황 단백질은 난황 분말을 에탄올로 추출하여 사용하였고 효소 가수분해 전에 90°C에서 열처리하였다. 다른 모든 시약은 특급 이상을 사용하였다.

*Corresponding author

Tel : +82-51-890-1702, Fax : +82-51-890-1694

E-mail : bckang@deu.ac.kr

효소 고정화

Duolite A568에 효소 고정화 방법은 담체의 활성화와 효소 고정화 두 단계로 실시되었다. 담체 활성화 방법은 다음과 같다. Duolite A568 1.0 g에 증류수 10 ml로 10분간 교반 세척한 다음 원심 분리하였고 여기에 1M HCl 5 ml를 투입한 후 증류수 세척과 같은 방법으로 실시하였고 그 다음에 1M NaOH 5 ml를 투입한 후 10분간 교반 세척 후 원심 분리하였다. 마지막으로 증류수 10 ml를 넣고 세척한 후 0.1 M Tris-HCl 완충 용액(pH 9.0) 10 ml로 2회에 걸쳐 담체를 세척하였다. 이와 같이 활성화된 담체에 효소를 고정화하였는데 Duolite A568 1.0 g을 8.0 mg/ml 효소용액 20 ml에 첨가하고 4°C에서 24시간 동안 교반 하면서 고정화하였다. 고정화된 효소를 완충 용액으로 세척하였다. Silica gel 60과 Celite R640의 효소고정화는 각각 담체 1.0 g을 0.1 M Tris-HCl 완충 용액(pH 9.0)으로 제조된 8.0 mg/ml 효소용액 20 ml에 첨가하고 4°C에서 24시간 동안 교반 하면서 고정화하였다. 고정화된 효소를 완충 용액을 사용하여 세척하였다. Dowex에 효소를 고정화하기 위해서는 우선 담체 1 g을 완충용액 25 ml에 첨가하고 상온에서 24시간 교반 하면서 담체가 완충용액에 평형이 되도록 하였다. 담체를 회수하여 8.0 mg/ml 효소용액 20 ml에 첨가하고 4°C에서 24시간 동안 교반 하면서 고정화하였다.

효소 활성 측정

단백질 분해 효소 활성은 다음과 같이 측정하였다. Tris-HCl buffer (0.1 M, pH 9.0)에서 제조된 1.5% (w/v)의 수용성 casein 2 ml에 자유효소의 활성을 측정하는 경우에는 8.0 mg/ml 효소용액 1 ml 혹은 고정화 효소 활성 측정인 경우에는 무게가 측정된 고정화 효소를 넣고 반응 용액으로 하였다. 반응용액을 37°C에 항온조에서 10분간 반응한 후, 15% (w/v) Trichloroacetic acid 2 ml를 넣고 반응을 중지시켰다. 0.5 M의 Na_2CO_3 용액 5 ml에 증류수 1 ml와 Folin 시약 1 ml를 넣고 원심분리 후 얻어진 상등액과 혼합하여 37°C에서 30분 동안 반응하여 발색시켰다. 660 nm에서 tyrosine을 표준으로 흡광도를 측정하여 효소 활성을 결정하였다[7]. 효소 활성 1 unit는 분당 tyrosine 1 μmol 을 생성시키는 효소의 양으로 정의한다. 자유 효소와 고정화 효소의 단백질 양은 Lowry 방법으로 Bovine serum albumin을 표준으로 하여 측정하였다[12].

최적의 pH와 온도

자유 효소와 고정화 효소 활성에 대한 최적의 pH와 온도를 다음과 같이 조사하였다. pH는 50°C에서 0.1 M NaOH나 HCl로 조절하면서 6에서 11까지 변화시켰다. 온도는 pH 9에서 35°C부터 65°C까지 변화시켰다.

pH 안정성

자유 효소와 고정화 효소를 pH 6에서 11의 조건에서 2시간

동안 반응 시킨 후 효소 활성을 측정하였다.

열 안정성

자유 효소와 고정화 효소의 열 안정성은 Tris-HCl buffer (0.1 M, pH 9.0)에서 온도를 달리하면서 30분간 반응시킨 후 남아있는 효소활성을 측정하고 이것을 원래의 효소 활성에 대한 비율로서 표시하였다.

재사용 회분식(repeated batch) 작업

고정화 효소의 재사용 성능을 평가하기 위해 고정화 효소를 2시간 동안 casein의 가수분해를 실시한 후 고정화 효소를 증류수로 1회 그리고 Tris-HCl buffer (0.1 M, pH 9.0)로 2회 세척한 후 다시 반응을 실시하였다. 각 반응 단계에서 고정화 효소의 활성을 측정하였다.

충진층(packed-bed) 반응기 작업

충진층 반응기의 길이는 20 cm, 내부지름은 2.8 cm이고 sintered glass filter와 water jacket을 부착하여 온도조절이 가능하게 하였다. 충진층 반응기에 고정화 효소를 투입하고 난황 단백질 용액을 부피유속을 달리하면서 공급하였다. 연속공정에서는 원료인 난황단백질 용액의 오염을 방지하기 위해 4°C 항온조에서 용액을 유지하였다. 고정화된 효소 30 g을 충진층 반응기에 투입한 후 peristaltic 펌프(Eyela MP-3, Japan)로 원료 난황단백질 용액을 반응기에 공급하였다. 충진층 반응기를 이용한 연속공정의 개괄도가 Fig. 1에 나타내었다. 연속 공정에서는 5시간의 간격마다 시료채취를 하였으며 96 시간 동안 운전하면서 효소의 활성을 측정하였다. 부피유속을 30에서 110 ml/hr로 변화시키면서 고정화된 효소의 활성 및 운전 정

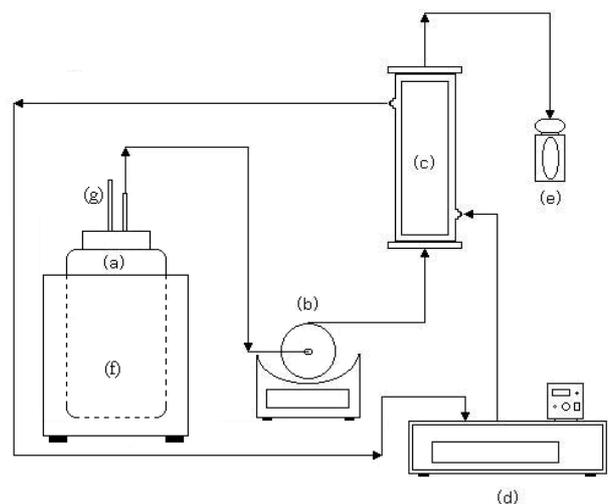


Fig. 1. Schematic Diagram of packed-bed reactor system. (a) feed reservoir, (b) peristaltic pump, (c) packed column enzyme reactor, (d) water bath, (e) cryogenic vial (sampling bottle), (f) cooler, (g) air filter.

Table 1. Immobilization yield of alkaline protease on different carriers by adsorption

Carriers	Added enzyme (U/g carrier)	Unbound enzyme (U/g carrier)	Bound enzyme (U/g carrier)	Immobilization yield (%)
Silica gel 60	1000	760.2	44.4	18.5
Celite R640	1000	730.9	56.5	21.0
Duolite A568	1000	803.9	48.4	24.7
Dowex 1	1000	823.2	8.1	4.6
Dowex W50	1000	830.2	15.3	9.0

능을 평가하였다. 또한 난황 단백질을 원료로 사용하였을 때 casein과 연속 조업의 특성을 비교하였다.

결과 및 고찰

효소 고정화 효율

사용된 5가지 담체에 대한 효소의 고정화 효율을 비교하였다(Table 1). 고정화 효율은 고정화 효소활성에 대한 투입된 효소활성과 여액으로 나가는 효소활성의 차를 나누어 주어 그것의 백분율로 결정하였다. 이온교환수지인 Duolite A568에 대한 고정화 효율이 24.7%로 가장 높았다. 따라서 본 실험에서는 Duolite A568을 고정화 담체로 선정하여 실험하였다. 무기담체인 Silica gel 60과 Celite R640에서도 효소 고정화 효율이 Dowex에 비해 높음을 알 수 있다.

자유 효소와 고정화 효소의 최적 pH 비교

pH 변화에 자유효소와 Duolite 담체에 고정화된 효소의 활성을 비교하였다(Fig. 2). 자유효소의 경우는 pH 8에서 최대 활성을 보였고 고정화 효소는 pH 9에서 최대 활성을 보였다. 고정화 효소의 최적 pH가 자유효소와 달리 변화하는 이유는

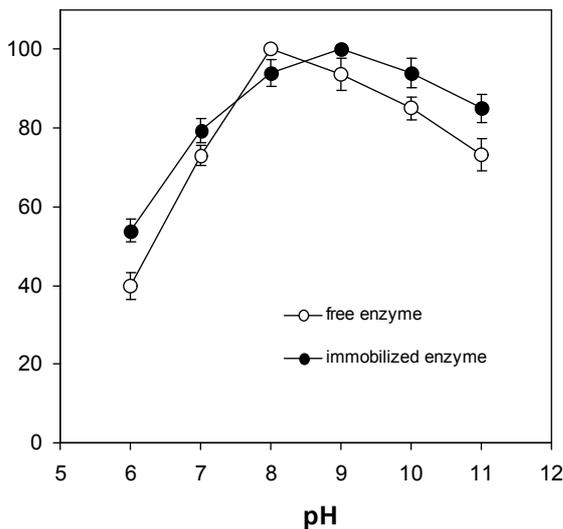


Fig. 2. Effect of pH on the relative activity of the free and immobilized enzyme.

담체에 효소가 고정화에 의해 효소의 미세 환경이 변화하기 때문이다[19]. 일반적으로 고정화 효소는 담체와 효소의 전하적인 결합에 의해 수소이온의 변화가 유발된다고 설명된다. 전체적인 pH 범위에서 자유효소에 비해 고정화 효소의 활성이 보다 넓게 분포됨을 알 수 있다. 이것은 고정화 효소의 활성이 pH 변화에 대해 덜 민감하게 작용하고 있음을 알 수 있다.

pH에 대한 안정성

pH에 대한 안정성을 평가하기 위해 각각 pH에서 2시간 동안 반응한 후 효소 활성을 측정하였다(Fig. 3). 고정화 효소가 각 pH에서 자유효소에 비해 안정성이 높음을 알 수 있다. 이것은 조업 조건에서 고정화 효소가 외부의 pH에 변화에 대해 덜 민감하게 작용하여 조업에 유리할 수 있다는 것을 제시한다.

자유 효소와 고정화 효소의 최적 온도 비교

온도 변화에 따른 자유효소와 고정화 효소의 활성을 비교하였다(Fig. 4). 온도가 증가할수록 자유 효소와 고정화 효소의 활성은 같은 경향으로 증가하였고, 두 경우 모두 50°C에서 최대 활성을 보였다. 50°C 이상으로 증가시킬 때 효소활성은 감소하였는데 자유효소의 활성이 고정화 효소에 비해 훨씬 더

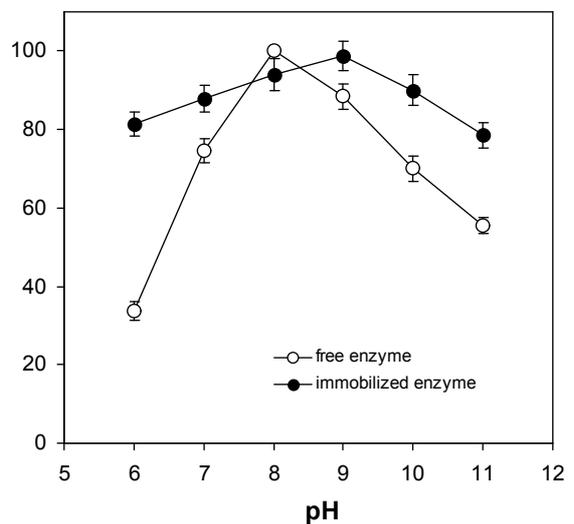


Fig. 3. pH stability of the free and immobilized enzyme.

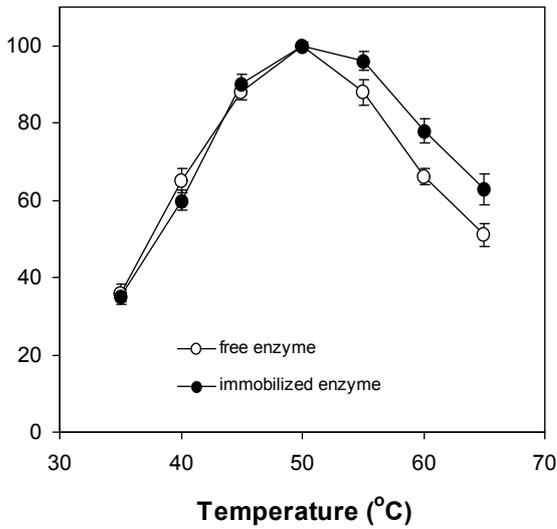


Fig. 4. Effect of temperature on the relative activity of the free and immobilized protease.

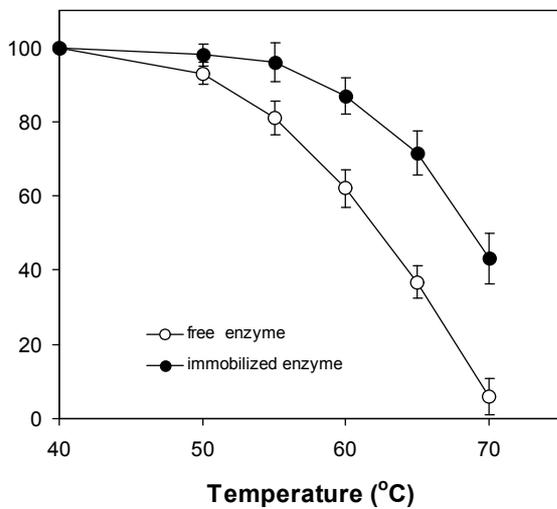


Fig. 5. Thermal stability of the free and immobilized enzyme.

빨리 감소하는 것을 알 수 있다. 이것은 고정화 효소가 온도에 덜 민감하게 작용하는데 이것은 고정화에 의해 열에 대한 안정성이 증가하였음을 나타낸다.

열 안정성

각각의 온도에서 30분 동안 효소반응을 진행한 후 자유 효소와 고정화 효소의 활성을 측정하여 열 안정성을 평가하였다 (Fig. 5). 고정화 효소가 자유 효소에 비해 높은 열 안정성을 나타냄을 알 수 있다. 이 결과는 담체와 효소의 이온결합에 의해 안정화되기 때문인데 자유 효소에 비해 고정화 효소 공정을 채택하는 이유이기도 하다[5].

재사용 회분식 운전

고정화 효소의 반복적인 재사용은 실제 공정의 응용에서

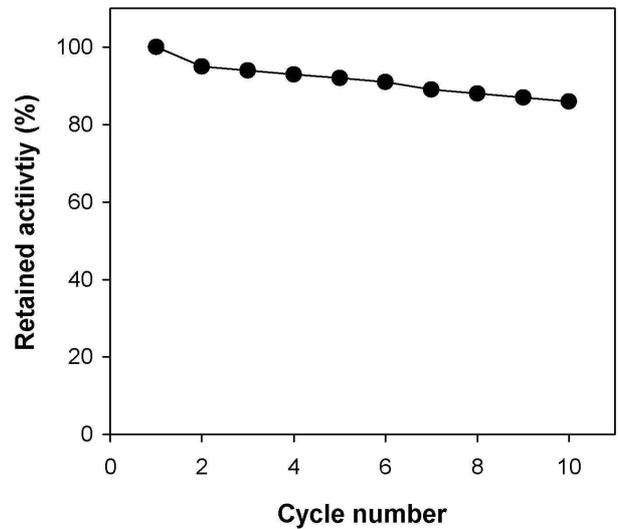


Fig. 6. Retained activity of the immobilized alkaline protease after cycles of repeated batch operation (initial activity was taken as 100%).

중요하다. 고정화 효소를 회분식 효소반응으로 2시간 반응을 시킨 후 고정화 효소를 세척하고 다시 효소반응을 반복적으로 실시하여 10 cycle 동안 효소 안정성을 측정하였다(Fig. 6). 10 cycle 후에 고정화 효소는 초기 활성의 86%를 유지하였다. 이 결과는 재사용 회분식 운전에서 고정화 효소가 안정적으로 효소활성을 유지하는 것을 보여준다. 일반적 경우 공유결합에 의한 고정화 효소의 활성이 물리적인 이온결합의 활성보다 높다고 보고되어 있지만, 이온결합에 의한 고정화 효소는 연속 조업에서 고정화 효소활성이 낮아지면 담체를 회수하여 효소를 고정화하여 재사용할 수 있기 때문에 담체의 가격이 높은 경우는 장점이 될 수 있다[1,14].

충진층 반응기 연속공정

충진층 효소 반응기에서 온도 50°C 그리고 pH 9에서 연속적으로 casein 용액을 공급하면서 유속을 30 ml/hr부터 110 ml/hr 변화시키면서 부피 유속 변화에 대한 고정화된 효소의 활성을 96시간 연속 조업 후 측정하였다(Fig. 7). 유속이 낮을수록 효소의 활성이 높음을 알 수 있는데 이것은 유속이 낮을수록 충진층 반응기에서 체류시간이 증가함으로 효소활성이 높게 나타난다. 연속 운전에서 유속이 증가할수록 초기에 비해 활성이 감소됨을 알 수 있다. 이것은 고정화 담체가 이온결합으로 인한 약한 결합력으로 유속이 증가할수록 효소의 washout이 되기 때문으로 생각된다[24]. 연속 조업에서 부피 유속을 30 ml/hr로 하여 casein과 난황 단백질을 사용하여 원료에 대한 고정화 효소의 활성에 대한 영향을 조사하였다 (Fig. 8). 96 시간 후 casein을 사용했을 경우 고정화 효소의 활성이 초기 활성의 83%를 유지하였지만 난황 단백질의 경우는 초기 활성의 61%를 유지하였다. 이것은 난황 단백질 원료

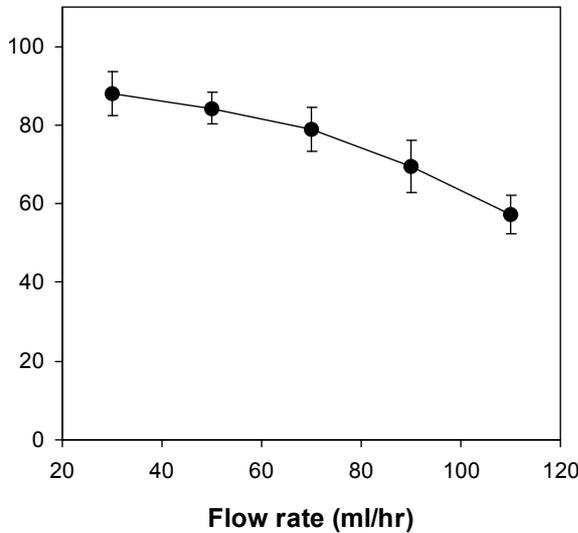


Fig. 7. Effect of flow rate on the activity of immobilized enzyme in continuous packed-bed reactor system.

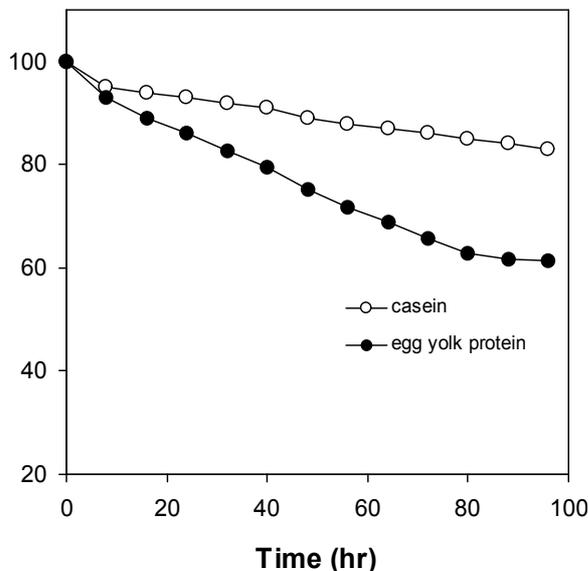


Fig. 8. Effect of raw materials in continuous packed-bed reactor system on the activity of the immobilized protease.

에는 여러 물질이 혼합되어 있기 때문에 연속 조업에서 고정화 효소의 비 활성화를 촉진하는 것으로 판단된다[19].

References

1. Ahmed, S. A., S. A. Saleh, and A. F. Abdel-Fattah. 2007. Stabilization of *Bacillus licheniformis* ATCC 21415 alkaline protease by immobilization and modification. *Aust. J. Basic Appl. Sci.* **1**, 313-322.
2. Altun, G. D. and S. A. Cetinus. 2007. Immobilization of pepsin on chitosan beads. *Food Chem* **100**, 964-971.
3. Bayramoğlu, G., M. Yılmaz, A. Ü. Şenel, and M. Y. Arica.

2008. Preparation of nanofibrous polymer grafted magnetic poly (GMA-MMA)-g-MAA beads for immobilization of trypsin via adsorption. *Biochem Eng J.* **40**, 262-274.
4. Benkhelifa, J., C. Bengoa, C. Larre, E. Guibal, Y. Popineau, and J. Legrand. 2005. Casein hydrolysis by immobilized enzymes in a torus reactor. *Process Biochem* **40**, 461-467.
5. Cao, L. 2005. Immobilized enzymes: science or art. *Curr. Opin. Chem Biol.* **9**, 217-226.
6. Gea, S., H. Bai, H. Yuan, and L. Zhang. 1996. Continuous production of high degree casein hydrolysates by immobilized proteases in column reactor. *J. Biotechnol.* **50**, 161-170.
7. Greenberg, D. M. 1957. Plant proteolytic enzymes. *Methods Enzymol.* **2**, 54-64.
8. Gutierrez, M. A., T. Mitsuya, H. Hatta, M. Koketsu, R. Kobayashi, L. R. Juneja, and M. Kim. 1998. Comparison of egg-yolk protein hydrolysate and soybean protein hydrolysate in terms of nitrogen utilization. *Br. J. Nutr.* **80**, 477-484.
9. Haider, T. and Q. Husain. 2008. Concanavalin A layered calcium alginate - starch beads immobilized β -galactosidase as a therapeutic agent for lactose intolerant patients. *Int. J. Pharm* **359**, 1-6.
10. Hong, J., P. Gong, D. Xu, L. Dong, and S. Yao. 2007. Stabilization of α -chymotrypsin by covalent immobilization on amine-functionalized superparamagnetic nanogel. *J. Biotechnol.* **128**, 597-605.
11. Juneja, L. R., M. Koketsu, K. Nishimoto, M. Kim, T. Yamamoto, and T. Itoh. 1991. Large-scale preparation of sialic acid from chalaza and egg-yolk membrane. *Carbohydr. Res.* **214**, 179-183.
12. Lowry, O. H., N. J. Rosenbrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem* **193**, 265-275.
13. Mannheim, A. and M. Cheryan. 1981. Continuous hydrolysis of milk protein in a membrane reactor. *J. Food Sci.* **55**, 381-385.
14. Mateo, C., J. M. Palomo, G. Fernandez-Lorente, J. M. Guisan, and R. Fernandez-Lafuente. 2007. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microb Technol.* **40**, 1451-1463.
15. Ortega, N., M. Perez-Mateos, M. C. Pilar, and M. D. Busto. 2009. Neutrase immobilization on alginate-glutaraldehyde beads by covalent attachment. *J. Agric. Food Chem* **57**, 109-115.
16. Parkinson, T. L. 1966. The chemical composition of eggs. *J. Sci. Food Agric.* **17**, 101-106.
17. Potumarthi, R., C. Subhakar, A. Pavani, and A. Jetty. 2008. Evaluation of various parameters of calcium-alginate immobilization method for enhanced alkaline protease production by *Bacillus licheniformis* NCIM-2042 using statistical methods. *Bioresour. Technol.* **99**, 1776-1786.
18. Puhl, A. C., C. Giacomini, G. Irazoqui, F. Batista-Viera, A. Villarino, and H. Terenzi. 2009. Covalent immobilization of tobacco-etch-virus NIa protease: a useful tool for cleavage of the histidine tag of recombinant proteins. *Biotechnol. Appl. Biochem* **53**, 165-174.

19. Roy, I. and M. N. Gupta. 2003. Lactose hydrolysis by Lactozym immobilized on cellulose beads in batch and fluidized bed modes. *Process Biochem* **39**, 325-332.
20. Sharma, S., A. Mittal, V. K. Gupta, and H. Singh. 2007. Improved stabilization of microencapsulated Cathepsin B in harsh conditions. *Enzyme Microb. Technol.* **40**, 337-342.
21. Silva, C., G. Gubitz, and A. Cavaco-Paulo. 2006. Optimization of a serine protease coupling to Eudragit S-100 by experimental design techniques. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **81**, 8-16.
22. Silva, C., Q. Zhang, J. Shen, and A. Cavaco-Paulo. 2006. Immobilization of proteases with a water soluble/insoluble reversible polymer for treatment of wool. *Enzyme Microb. Technol.* **39**, 634-640.
23. Wang, S., H. Bao, P. Yang, and G. Chen. 2008. Immobilization of trypsin in polyaniline-coated nano-Fe₃O₄/carbon nanotube composite for protein digestion. *Anal. Chim. Acta* **612**, 182-189.
24. Yu, X., Y. Li, C. Wang, and D. Wu. 2004. Immobilization of *Aspergillus niger* tannase by microencapsulation and its kinetic characteristic. *Biotechnol. Appl. Biochem* **40**, 151-155.

초록 : 충전층 반응기에서 고정화 효소에 의한 난황 단백질의 가수분해

강 병 철*

(동의대학교 화학공학과)

난황단백질 가수분해를 위한 알칼리성 단백질분해효소를 5가지 담체 Duolite A568, Celite R640, Dowex-1, Dowex 50W 그리고 Silica gel R60 에 고정화하였다. Duolite A568의 경우에 24.7%의 최대 고정화 효율을 나타내었다. 자유 효소와 고정화 효소에 대한 최적의 pH는 각각 8과 9였고, 최적의 pH는 고정화에 의해 염기성으로 1만큼 증가하였다. 그러나 최적 온도는 자유 효소와 고정화 효소 모두 50°C로 같았다. 고정화 효소가 자유 효소에 비해 높은 열 안정성을 보였다. 재사용 회분식 공정에서 10 cycle 동안 효소활성은 초기 활성의 86%를 유지하였다. 연속 공정을 위한 충전층 반응기에서 여러 유속에 대한 장기 조업에서 효소 활성의 안정성 평가하였는데 낮은 유속일수록 높은 활성을 유지하였다. 연속 조업에서 casein과 난황 단백질을 사용하여 원료에 대한 고정화 효소의 활성에 대한 영향을 조사하였다. 96시간 연속 조업에서 casein의 경우는 초기 활성의 83%를 유지하였고 난황 단백질의 경우는 초기 활성의 61%를 유지하였다.