

Characteristics of Lactose Hydrolysis by Immobilized β -Galactosidase on Chitosan Bead

Byung Chul Kang*

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

Received November 29, 2010 / Accepted December 17, 2010

β -Galactosidase was immobilized on chitosan bead by covalent bonding using glutaraldehyde. The characteristics of the immobilized enzyme were investigated. Maximum immobilization yield of 75% was obtained on chitosan bead. Optimum pH and temperature for the immobilized enzyme was 7.0 and 50°C, respectively. The immobilized enzyme showed a broader range of pH and temperature compared to a free one. A mathematical model for the operation of the immobilized enzyme in a packed-bed reactor was established and solved numerically. Under different inlet lactose concentrations and feed flow rate conditions, lactose conversion was measured in a packed-bed reactor. The experimental results of continuous operation in a packed-bed reactor were compared to theoretic results using Michaelis-Menten kinetics with competitive product inhibition and external mass transfer resistance. The model predicted the experimental data with errors less than 5%. Process optimization of continuous operation in a packed-bed reactor was also conducted. In a recirculation packed-bed operation, conversion of lactose was 97% in 3 hours. In a continuous packed-bed operation, the effect of flow rate and initial lactose concentration was investigated. Increasing flow rates and initial lactose concentration decreased the conversion of substrate.

Key words : Packed-bed reactor, lactose hydrolysis, galactosidase, mathematical model

서 론

유당 가수분해 효소인 β -galactosidase를 이용한 공정은 산업적으로 널리 이용되고 있다[3]. 유당을 제거한 우유 가공식품이나 유당분해효소결핍증(lactose intolerance)이 있는 사람들을 위한 유당이 감소된 우유의 제조 등에 β -galactosidase가 사용되고 있다[11,19]. 또한 유가공 산업에서 유장(whey)에 함유된 유당으로 인한 폐수처리 비용을 줄이는 방법으로 β -galactosidase를 이용한 분해공정이 사용된다[21]. 이런 처리공정을 통해 발생하는 부산물은 동물사료 첨가제로 이용할 수 있다[4].

고정화 효소를 통한 연속 공정은 제품의 회수가 용이하여 분리 정제 비용을 감소시킬 수 있고, 고정화에 의해 효소촉매가 반응하는 좋은 환경을 제공할 수 있고, 또한 효소를 계속적으로 재사용할 수 있는 장점이 있다. 유당의 효소 분해 공정에서도 여러 고정화 방법을 사용하여 연구되었다[7,10,17,18]. 유당 분해를 위한 효소 고정화 담체에 대한 여러 연구가 진행되어 왔다. Roy와 Gupta는 cellulose bead를 사용하여 유동층반응기에서 60%의 유당전환율을 얻었고[20], Bayramoglu 등은 magnetic 담체에 효소를 고정화 하였고[1], Li 등은 cotton fabric에 고정화된 충전층 반응기로 하였고[14], 그리고 Zhou와 Chen은 graphite slab에 효소를 고정화 하였다[23]. 키토산은

키틴이 탈아세틸화된 유도체로서 높은 기공성과 친수성 성질을 가진 고분자로서 분말, granule 혹은 펠름의 형태로 되어있다. 키토산은 가격이 저렴하고 독성이 없으며 화학적으로 안정하기 때문에 크로마토그래피, 화학분석, 환외여과 그리고 여러 식품과 산업분야에서 널리 응용되고 있다. 또한 그 동안 키토산을 효소 고정화용 담체로 사용하는 시도가 있었다 [2,5,22]. 키토산 담체에 대한 고정화 효소의 연구는 고정화 방법의 개선이나 고정화에 대한 pH나 온도와 같은 환경 요인이 미치는 영향에 대해서 조사하였다. 본 연구에서는 키토산 담체에 고정화 방법의 개선과 더불어 산업적 응용이 가능하도록 수학적 모델링을 통한 효소반응 속도식에 대한 매개변수를 결정하였다. 또한 상업화의 가능성이 높은 충전층 반응기에서 연속 조업을 실시하고 수학적 모델링으로부터 그 결과를 예측하여 반응기의 scale-up에 필요한 기본 자료를 확보하였다.

고정화 효소의 연속 공정에 대한 반응기로는 유당분해 공정에서는 충전층 반응기가 좋은 성능을 나타낼 수 있다. 유당분해 공정에서 발생하는 산물인 갈락토스(galactose)가 효소반응속도의 저해를 유발하기 때문에 연속고반탱크 반응기보다 높은 반응속도를 유지할 수 있는 충전층 반응기와 같은 관형(tubular type) 반응기가 선호된다. 또한 이와 같이 충전층 반응기의 연속조업을 통해 높은 효율과 기질의 전환율을 얻을 수 있다.

본 연구는 유당의 가수 분해를 위해 키토산 담체에 공유결합으로 효소를 고정화하여 최적의 pH와 온도를 결정하고 충전층 반응기를 사용하여 연속식 운전을 실시하여 조업조건에

*Corresponding author

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

E-mail : bckang@deu.ac.kr

다른 반응기의 성능을 평가하였다. 충전층 반응기에 대한 물질전달 저항과 경쟁적 저해를 가진 Michaelis-Menten식을 사용하여 물질수지(mass balance)식을 확립하여 수치적으로 해석하였고 이것을 실험 결과와 비교하였다.

재료 및 방법

이론

효소 β-galactosidase에 의한 유당 분해 반응 속도식은 생산물에 의한 경쟁적 저해를 갖는 Michaelis-Menten 식으로 아래와 같이 표시된다[12].

$$v = - \frac{V_m S}{K_m \left(1 + \frac{P}{K_I} \right) + S} \tag{1}$$

여기서 $V_m = kE_o$ 이고 V_m 은 최대 반응속도를 나타내고, k 는 효소의 비활성역가(specific activity)이고 E_o 는 효소의 초기 농도이다. K_m 은 Michaelis-Menten 상수이고 K_I 는 경쟁적 저해 상수이고 S 와 P 는 각각 유당과 갈락토스의 농도를 나타낸다. 수학적 모델에서 갈락토스의 농도는 화학반응식에 의해 유당 1mol 분해에서 포도당과 갈락토스를 각각 1 mol을 생성하기 때문에 유당의 초기 농도에서 현재 기질의 농도를 뺀 $P = S_o - S$ 로 표시할 수 있다.

효소의 활성 감소는 여러 요인에 의해 발생되지만 가장 간단한 메커니즘은 아래와 같은 Arrhenius 의 1차 속도식을 따른다고 가정한다.

$$E = E_o e^{-k_d t} \tag{2}$$

여기서 k_d 는 효소의 비활성화에 대한 속도 상수이고 E_o 와 E 는 각각 초기와 임의의 시간 에서 효소 농도이다.

충전층 반응기에서 기질의 농도에 따른 정상 상태에서의 물질 수지는 다음과 같다.

$$D_z \frac{d^2 S}{dz^2} - u \frac{dS}{dz} = v \tag{3}$$

여기서 D_z 는 반응기 축 방향의 분산 계수(axial dispersion coefficient)이고 u 는 선 속도이고 v 는 효소반응속도이고 z 는 반응기 길이를 나타내는 변수이다. 일반적으로 축 방향의 분산 계수는 무시할 수 있기 때문에 위의 (3)식은 다음과 같이 표시된다[15].

$$-u \frac{dS}{dz} = v \tag{4}$$

위의 방정식에 대한 경계 조건은 $z=0$ 에서 $S = S_o$ 이다. 그리고 반응속도 v 는 고정화 효소 담체 표면에서의 반응 속도로 다음과 같이 표시된다.

$$v = - \frac{V_m S_i}{K_m \left(1 + \frac{S_o - S_i}{K_I} \right) + S_i} \tag{5}$$

여기서 S_i 는 고정화 효소 표면에서의 기질 농도이다.

고정화 효소 담체와 충전층 유체 사이에서는 외부 물질전달 저항이 작용하기 때문에 관계 식은 다음과 같다.

$$k_L a (S - S_i) = \frac{V_m S_i}{K_m \left(1 + \frac{S_o - S_i}{K_I} \right) + S_i} \tag{6}$$

여기서 k_L 는 물질전달계수이고 a 는 반응기 부피에 대한 표면적을 나타내는데 고정화 담체가 구형인 경우에는 다음과 같이 표시된다.

$$a = \frac{6(1 - \varepsilon)}{d_p} \tag{7}$$

여기서 ε 은 공극율(void fraction)이고 d_p 는 담체의 입자 직경이다. 그리고 물질전달계수 k_L 은 아래와 같이 Colburn j factor를 이용해 결정하였다[8].

$$j_D = \frac{Sh}{Sc^{1/3} Re} \tag{8}$$

여기서 $Sh = \frac{k_L d_p}{D}$, $Re = \frac{\rho d_p u}{\mu}$, $Sc = \frac{\mu}{\rho D}$ 으로 표시되는 무차원 그룹이고, D 는 유당의 확산계수이고 ρ 와 μ 는 각각 유체의 비중과 점도를 나타낸다. j_D 는 아래 상관관계식에 구한다[6].

$$ej_D = \frac{0.765}{Re^{0.82}} + \frac{0.365}{Re^{0.386}} \tag{9}$$

위의 식들의 계산을 위해 사용된 소프트웨어는 Matlab이었고 수학적 모델에 대한 예측 결과를 도출하였고 또한 이것을 실험 결과와 비교하였다.

효소 및 시약

고정화 담체로 사용된 키토산 분말은 Sigma (St. Louis, USA)에서 구입하였고 효소인 β-galactosidase는 상업적으로 사용되는 Lactozym 3000L (Novozymes, Denmark)을 구입하여 사용하였다. Glutaraldehyde와 o-nitrophenyl β-D-galactopyranoside (ONPG)은 Sigma (St. Louis, USA)에 구입하였고 다른 모든 시약들도 1급 이상을 사용하였다.

효소 고정화

1 % (w/v) 키토산 용액에 무수 아세트산을 첨가하여 아세트산의 농도를 1 % (w/v)으로 하였다. 60°C로 가열한 후 불용성 물질을 제거하기 위해 여과하였다. 노즐 직경이 5 mm인 주사기(syringe)에 키토산 용액을 넣고 1 M KOH 용액 500 ml에

잘 혼합하면서 주사기로 투입하였다. 생성된 키토산 담체를 경화시키기 위해 상온에서 4 hr 동안 교반 하였다. 직경이 5 mm의 균일한 형태로 담체가 생성되었고 인산완충용액으로 3회 세척과 여과한 후에 담체를 4°C로 인산완충용액에 보관하였다.

효소를 담체에 고정화하는 가교제로 glutaraldehyde를 사용하였고 인산완충용액(50 mM, pH 7.0)에서 glutaraldehyde의 농도를 1에서 5%(v/v)로 변화시키면서 상온에서 12 hr 동안 혼합하여 키토산 담체를 활성화하였다. 활성화된 키토산 담체에 결합되지 않은 잔류 glutaraldehyde를 제거하기 위해 인산완충용액으로 5회 세척하였다. 4°C에서 효소 Lactozym 3000L 0.1~1 ml를 담체 1 ml에 첨가한 후 12 hr 동안 고정화하였다. 고정화되지 않은 효소 단백질을 제거하기 위해 인산완충용액(50 mM, pH 7.0)으로 3회 세척하였다. 고정화 효소를 4°C에서 인산완충용액(50 mM, pH 7.0)에 보관하였다. 효소가 담체에 고정화되는 효율은 아래의 관계를 이용하여 측정하였다.

$$\text{Immobilization yield(\%)} = \frac{\text{Immobilized enzyme activity(U)}}{\text{Total enzyme activity added(U)}} \times 100$$

여기서 고정화 효소의 활성은 투입된 효소의 활성에서 고정화되지 않고 배출된 효소의 활성을 뺀 값이다.

효소 활성 측정

3.0 mM의 MgCl₂를 포함하는 인산 완충용액(50 mM, pH 7.0) 1.0 ml와 14 mM의 ONPG 0.5 ml를 혼합하여 반응용액으로 하였다. 자유 효소의 경우에는 효소용액 0.1 ml를 그리고 고정화 효소의 경우에는 질량이 측정된 담체 1개 혹은 2개를 반응용액에 첨가한 후 항온조에서 35°C, 10 min 동안 반응시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소 활성은 ONPG가 반응하여 o-nitrophenol을 생성하는 양에 비례하여 증가한다. β-galactosidase 활성 1 unit는 인산 완충용액(50 mM, pH 7.0)에서 1 min 동안 1 mmol의 ONPG를 분해하는 효소의 양으로 정의한다.

단백질의 양은 Lowry 방법으로 분석하였다[16]. 고정화 효소의 단백질 양은 고정화를 위해 투입된 효소 단백질의 양에서 고정화되지 않고 빠지는 효소의 양을 뺀 것으로 계산하였다. 담체에 고정화된 효소 단백질의 양은 23 mg enzyme/g bead이었다.

pH와 온도에 따른 효소 활성 측정

자유 효소와 고정화 효소 활성에 대한 최적의 pH와 온도를 다음과 같이 조사하였다. pH는 50°C에서 0.1 M NaOH나 HCl로 조절하면서 5에서 9까지 변화시켰다. 온도는 pH 7에서 30에서 70°C 변화시켰다. pH와 온도 변화에 대한 실험에서 최대 활성을 나타내는 활성도를 100%로 하여 나머지 결과와 비교하였다.

반응식 상수의 결정

식(1)의 속도식에서 반응식의 상수 k , K_m 그리고 K_i 를 결정하기 위해 회분식 반응기에서 유당분해 반응을 실시하였다. 회분식 반응기는 지름 6 cm 와 높이 10 cm인 유리용기로서 온도 조절을 위한 jacket이 설치되어 있다. pH 7.0과 50°C에서 유당 용액 100 ml를 제조하는데 이 때 유당 농도를 50에서 300 mM로 변화시키면서 여기에 효소 용액 1 ml를 첨가하여 반응을 진행하면서 생성된 포도당의 양을 효소 법으로 측정하였다.

식(2)에서 Arrhenius식의 효소활성 감소에 대한 상수 k_d 를 결정하기 위해 반응을 시작할 때 100% 활성으로 하고 시간에 대한 상대적인 효소활성을 측정하고 선형회귀로 그 값을 구하였다.

충진층 반응기에서 연속 운전

충진층 반응기의 길이는 20 cm, 내부지름은 2.8 cm 이고 sintered glass filter와 water jacket을 부착하여 온도조절이 가능하게 하였다[13]. 충진층 반응기에 고정화 효소 30.0 g 을 투입하였고 이 때 공극률(ϵ)은 0.40이었다. 충진층 반응기와 고정화 효소에 관련된 데이터를 Table 1에 나타내었다. 재순환 충진층 반응기 조업에서는 유량 100 ml/hr에서 유당 농도 100과 500 mM로 하여 계속적으로 재순환을 통해서 시간에 따른 유당의 전환율을 측정하였다.

충진층 반응기에서 연속 공정의 조업 조건에 따른 반응 성능을 평가하기 위해 유량과 반응기로 공급되는 유당의 농도를 달리하면서 반응기에서 나오는 유당의 전환율을 측정하였다. 공급되는 유당의 농도에 대한 반응기 성능을 평가하기 위해 pH 7.0에서 peristaltic 펌프로 유량을 250 ml/hr로 하고 유당 농도를 50~500 mM 범위에서 실시하였다. 유량에 대한 영향을 조사하기 위해 유량의 범위를 100~500 ml/hr 범위에서 변화시키면서 반응기 성능을 평가하였다. 반응기에서 유당의 전환율은 정상상태에 도달하는 것을 고려하여 운전 시

Table 1. Characteristics of reactor and immobilized bead employed in this study

Packed-bed reactor	
Length (cm)	20
Diameter (cm)	1.8
Cross section (cm ²)	2.54
Total volume (cm ³)	50.8
External surface/volume (cm ⁻¹)	7.2
Bed characteristics	
Bead diameter (cm)	0.5
Bead density (g cm ⁻³)	1.09
Total bead weight (g)	33.2
Free volume (cm ³)	20.3
Porosity ϵ	0.40

작 30 min 후에 포도당 농도를 측정하여 평가하였다. 공정의 안정성을 평가하기 위해 고정화 효소의 활성이 초기 활성의 50%가 될 때까지 실시하였다. 충전층 반응기 연속운전에서 얻어진 유당 전환율에 대해 실험결과와 생산물 경쟁적 저해를 갖는 Michaelis-Menten 반응식과 외부 물질전달저항이 포함된 Matlab 언어로 작성된 프로그램을 통한 예측 값과 비교하였다.

결과 및 고찰

고정화 효율

효소를 고정화할 때 담체에 투입되는 glutaraldehyde의 농도와 투입되는 효소의 양을 달리하면서 고정화 효율을 비교하였다. Glutaraldehyde의 농도에 따라서 고정화 효율을 조사하였는데 glutaraldehyde의 농도가 낮을수록 고정화 효율은 증가함을 알 수 있다(Fig. 1a). 1%(v/v) glutaraldehyde 농도에서 고정화 효율은 75% 이었다. 가교제 glutaraldehyde의 농도를 1%(v/v)로 유지하고 투입되는 효소의 양에 따른 고정화 효율을 조사하였는데(Fig. 1b), 투입되는 효소의 양을 증가할수록 고정화 효율은 증가함을 알 수 있다. 투입된 효소의 양이 100

U 근방에서 고정화 효율은 최대를 보였고 그 이상에서는 투입되는 효소 활성을 증가시켜도 고정화 효율은 증가하지 않고 일정하게 유지됨을 알 수 있다.

pH와 온도에 따른 효소 활성

pH를 5에서 9까지 변화시키면서 효소 활성을 측정하여 고정화 효소의 최적 pH를 결정하고 이것을 자유 효소와 비교하였다(Fig. 2a). 최적의 pH는 자유 효소와 고정화 효소 모두 7.0을 나타내었다. 고정화 효소에서 pH에 대한 활성 분포가 자유효소보다 넓게 나타났다. 이것은 효소의 고정화로 인한 담체와 효소 사이가 안정화되었다는 것을 설명한다.

온도를 30에서 70°C로 변화시키면서 자유 효소와 고정화 효소 활성을 측정하여 최적의 온도를 결정하였다(Fig. 2b). 온도를 증가시킬수록 효소 활성은 증가하였는데 50°C까지는 자유 효소와 고정화 효소 모두 같은 경향으로 증가하였다. 최적의 활성은 두 경우 모두 50°C에 나타났고 그 이후로는 활성이 감소하였다. 활성이 감소할 때 자유 효소의 경우 고정화 효소에 비해 더 빨리 감소함을 알 수 있다. 이것은 고정화 효소의 장점을 나타내는데 담체와 효소의 결합으로 인해 열에 안정됨을 나타낸다[9].

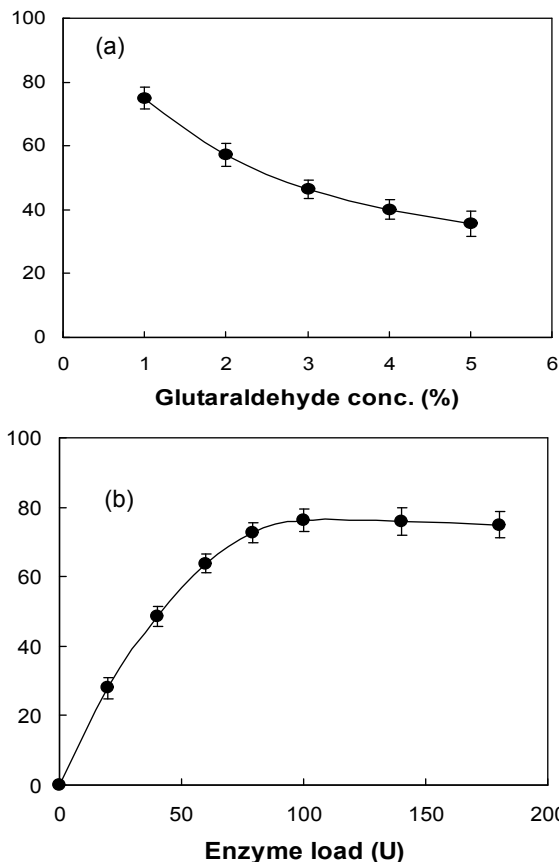


Fig. 1. Effect of (a) glutaraldehyde concentration and (b) enzyme load on the immobilization yield.

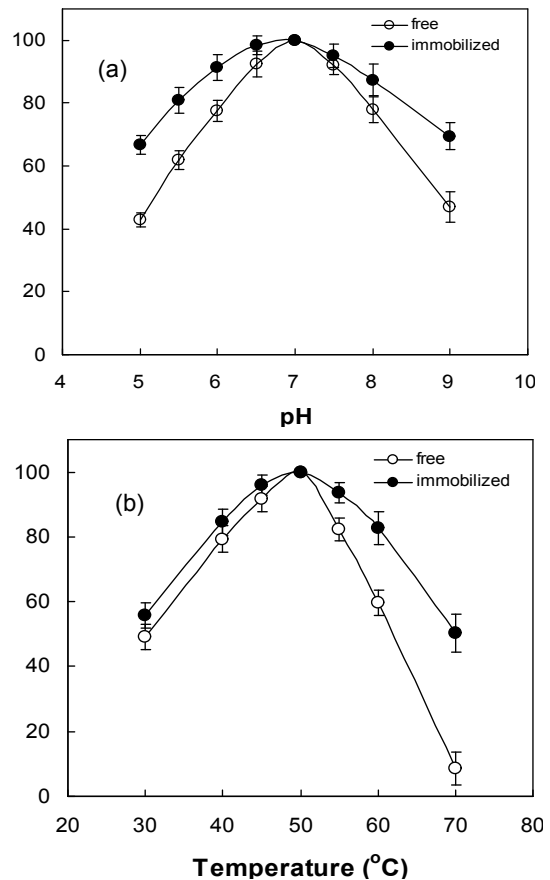


Fig. 2. Effects of (a) pH and (b) temperature on the relative activity of the free and immobilized enzyme.

열 안정성

열 안정성을 평가하기 위해 50°C에서 ONPG를 반응하면서 시간에 따른 자유 효소와 고정화 효소 활성 변화를 측정하여 비교하였다(Fig. 3). 전형적인 효소의 열에 대한 1차 Arrhenius 속도식에 따라 비활성화 경향을 보여주고 있다. 또한 자유 효소에 비해 고정화 효소의 활성이 열에 대해 안정성을 나타낼 수 있다.

반응속도 상수의 결정

회분식 반응기에서 유당의 농도를 달리하면서 유당 전환율을 측정하여 비선형 회귀법에 의해 반응식의 상수 k, K_m 그리고 K_I 를 결정하였다. 실험결과는 Table 2에 나타내었다. 결정된 $k=1.3 \pm 0.2 \times 10^{-3}$ mol/s/g enzyme, $K_m=0.137 \pm 0.003$ mol/dm³ 그리고 $K_I = 0.234 \pm 0.005$ mol/dm³ 이었다.

재순환 충전층 반응기 운전

공급되는 유당의 농도 100와 500 mM에 대한 충전층 반응기를 재순환 조업으로 운전하면서 시간에 대한 기질의 전환율을 측정하였다(Fig. 4). 투입 농도를 100 mM인 경우에 재순환 조업 3시간 후 기질 전환율이 97%에 도달하였다. 투입 농도를 500 mM인 경우 기질의 전환율은 5시간 후에 80%에 도달하였

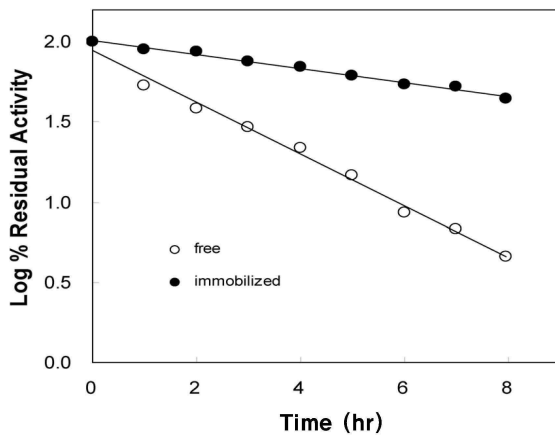


Fig. 3. Thermal stability of the free and immobilized enzyme.

Table 2. Lactose conversion in a batch reactor with varying initial lactose concentrations

Time (min)	Lactose conversion (%)			
	So=50 mM	100 mM	200 mM	300 mM
2	12	8	6	4
4	18	14	10	8
6	26	20	14	11
8	32	26	19	15
10	41	34	24	19
15	54	46	34	28
20	65	57	43	35
25	73	64	52	43

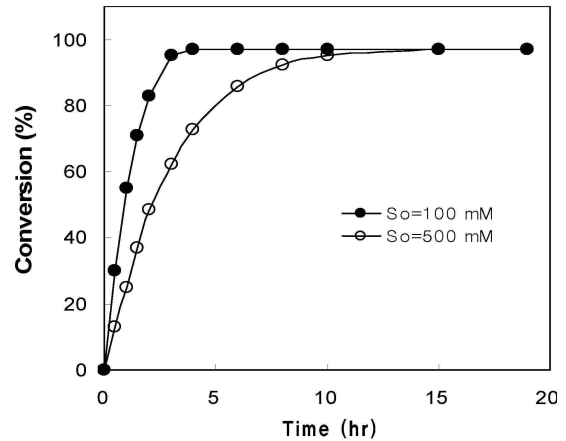


Fig. 4. The conversion of lactose in recirculation packed-bed operation.

다. 원료로 우유나 유장을 사용하는 경우에 비해 높은 전환율을 나타내는 것은 원료로 순수한 유당을 사용하기 때문에 우유나 유장에 비해 원료에 포함된 불순물이 없기 때문에 고정화 효소의 전환을 방해하는 요소가 없기 때문이라고 판단된다[20].

충진층 반응기 연속 조업

충진층 반응기 연속 조업에서 투입되는 유당 농도와 유량을 변화시키면서 유당의 전환율을 측정하여 이것을 이론적 예측 값과 비교하였다(Fig. 5). 공급되는 유당 농도를 50~500 mM 범위에서 그리고 유량은 100에서 500 ml/hr 범위에서 변화시키면서 유당 전환율을 측정하였다. 유량이 낮아수록 기질의 전환율은 증가함을 알 수 있고, 실험 결과와 이론적 예측 값 사이의 최대 오차는 5% 이내였다. 투입 기질 농도 100 mM에서 유량에 증가에 따라 기질의 전환율은 99에서 64%까지 감소하였고 500 mM에서 기질의 전환율은 97에서 44%까지 감소하

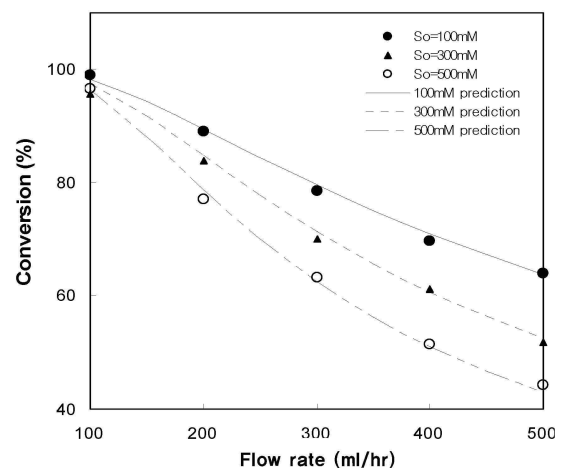


Fig. 5. Experimental data and model prediction for the lactose conversion of continuous operation with the same conditions.

였다. 이것은 유량이 증가할수록 기질의 공급속도가 증가하여 충전층 반응기에서 고정화 효소의 기질 전환 속도가 제한되기 때문이다. 하지만 높은 유량에 전환율은 낮지만 생산성의 관점에서 보면 생산성은 증가하게 된다.

유당의 농도 100 mM에서 투입되는 유량을 달리하면서 충전층 반응기의 길이에 따른 유당의 전환율을 수학적 모델에 의한 예측 결과를 나타내었다(Fig. 6). 반응기 길이의 반을 지날 때 부피유속 100, 300, 그리고 500 ml/hr 에서 각각 기질의 전환율은 86, 53 그리고 38%를 보였다. 유량이 낮을수록 충전층 반응기에서 높은 전환율을 나타냄을 알 수 있다. 충전층 반응기 운전에서 연속 조업의 안정성을 평가하기 위해 투입되는 유당의 농도를 100 mM로 하고 유량을 달리하면서 조업 시간에 따른 기질의 전환율의 수학적 모델에 의한 예측 결과를 나타내었다(Fig. 7). 조업 시간이 증가할수록 고정화 효소의 활성 감소로 인해 기질의 전환율이 감소함을 알 수 있다. 따라서 일정한 기질의 전환율을 유지하기 위해서는 충전층

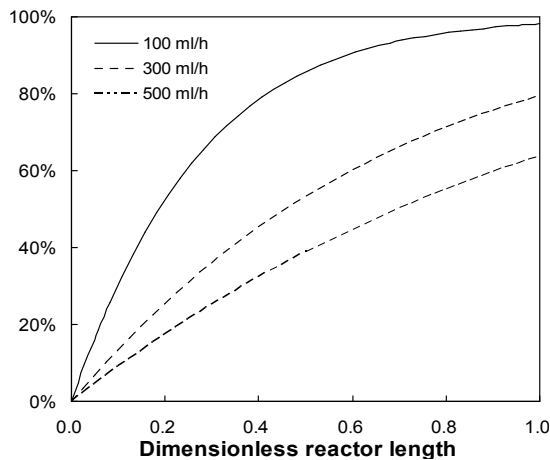


Fig. 6. Simulation of lactose conversion profiles in a packed bed reactor for the flow rates of 100, 300, and 500 ml/hr.

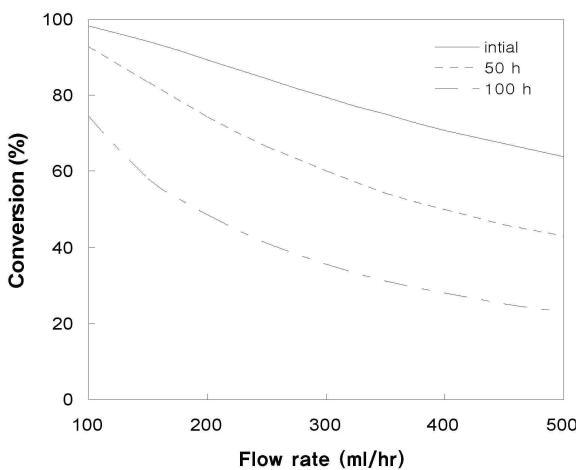


Fig. 7. Simulation of lactose conversion with the operation time in a packed bed reactor.

반응기의 연속조업에서 유량을 계속적으로 감소시켜야 한다. 기존의 키토산 담체에 대한 고정화 효소의 연구는 고정화 방법의 개선이나 고정화에 대한 pH나 온도와 같은 환경 요인이 미치는 영향에 대한 효소 고정화의 기본 연구를 진행하였다 [5]. 본 연구에서는 산업적 응용이 가능하도록 효소반응 속도식에 대한 매개변수를 수학적 모델링과 최적화 기술을 통해 결정하였다. 또한 상업화의 가능성이 높은 충전층 반응기에서 연속 조업을 실시하고 수학적 모델링으로부터 그 결과를 적용하여 실험 결과를 정확히 예측하였다. 또한 속도식과 충전층 반응기에 대한 수학적 모델링을 통해 기질 농도와 효소의 비활성화에 대해 충전층 반응기의 운전에 대한 simulation을 가능하게 하였고 상업적인 반응기의 scale-up에 필요한 기본 자료를 제공하였다.

감사의 글

이 논문은 2009학년도 동의대학교 교내연구비에 의해 연구되었음(2009AA184).

References

1. Bayramoglu, G., Y. Tunalib, and M. Y. Arica. 2007. Immobilization of β -galactosidase onto magnetic poly(GMA - MMA) beads for hydrolysis of lactose in bed reactor. *Catal Commun.* **8**, 1094-1101.
2. Bir6a, E., 6. N6metha, C. Sisaka, T. Feczko6a, and J. Gyenisa. 2008. Preparation of chitosan particles suitable for enzyme immobilization. *J. Biochem Biophys. Meth.* **70**, 1240-1246.
3. Chen, W., H. Chen, Y. Xi, J. Yang, J. Zhao, F. Tian, H. P. Zhang, and H. Zhang. 2009. Immobilization of recombinant thermostable β -galactosidase from *Bacillus stearothermophilus* for lactose hydrolysis in milk. *J. Dairy Sci.* **92**, 491-498.
4. Demirhan, E. and B. Ozbek. 2007. Effect of glucose and galactose on whey lactose hydrolysis and enzyme stability under sonic treatment. *J. Biotechnol.* **131**, S217.
5. Dwevedia, A. and A. M. Kayastha. 2009. Optimal immobilization of β -galactosidase from Pea (PsBGAL) onto Sephadex and chitosan beads using response surface methodology and its applications. *Bioresour. Technol.* **100**, 2667-2675.
6. Dwidevi, P. N. and S. N. Upadhyay. 1977. Particle-fluid mass transfer in fixed and fluidized beds. *Ind Eng. Chem Process Des. Dev.* **16**, 157-165.
7. Elnashar, M. M. M. and M. A. Yassin. 2009. Lactose hydrolysis by β -galactosidase covalently immobilized to thermally stable biopolymers. *Appl. Biochem Biotechnol.* **159**, 426-437.
8. Fogler, H. S. 2006. Elements of chemical reaction engineering. pp 784-785, 4th eds., Prentice Hall. Englewood Cliffs, New Jersey.
9. Gekas, V. and M. Lopez-Leiva. 1985. Hydrolysis of lactose: a literature review. *Process Biochem.* **20**, 2-12.
10. Grosov61, Z., M. Rosenberg, M. Rebroš, M. Šipocz, and B.

- Sedláčková I. 2008. Entrapment of β -galactosidase in polyvinylalcohol hydrogel. *Biotechnol. Lett.* **30**, 763-767.
11. 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.
 12. Jurado, E., F. Camacho, G. Luzon, and J. M. Vicaria. 2002. A new kinetic model proposed for enzymatic hydrolysis of lactose by a β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *Enzyme Microb. Technol.* **31**, 300-309.
 13. Kang, B. C. 2010. Hydrolysis of egg yolk protein in a packed bed reactor by immobilized enzyme. *J. Life Sci.* **20**, 1656-1661.
 14. Li, X., Q. Zhoua, and X. D. Chen. 2007. Pilot-scale lactose hydrolysis using β -galactosidase immobilized on cotton fabric. *Chem. Eng. Process.* **46**, 497-500.
 15. Lortie, R. 1994. Evaluation of the performance of immobilized enzyme reactors with Michaelis-Menten kinetics. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **60**, 189-193.
 16. 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.
 17. Mateoa, C., J. M. Palomoa, G. Fernandez-Lorentea, J. M. Guisan, and R. Fernandez-Lafuente. 2007. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microb. Technol.* **40**, 1451-1463.
 18. Neria, D. F. M., V. M. Balcãoa, M. G. Carneiro-da-Cunhab, L. B. Carvalho, and J. A. Teixeira. 2008. Immobilization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* onto a polysiloxane - polyvinyl alcohol magnetic (mPOS - PVA) composite for lactose hydrolysis. *Catal. Commun.* **9**, 2334-2339.
 19. Panesar, P. S. 2008. Application of response surface methodology for maximal lactose hydrolysis in whole milk using permeabilised yeast cells. *J. Acta Alimentaria* **37**, 191-203.
 20. 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.
 21. Szczodrak, J. 2000. Hydrolysis of lactose in whey permeate by immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *J. Mol. Catal. B.* **10**, 631-637.
 22. Wentworth, D. S., D. Skonberg, D. W. Donahue, and A. Ghanem. 2004. Application of chitosan-entrapped β -galactosidase in packed-bed reactor system. *J. Appl. Poly. Chem.* **91**, 1294-1299.
 23. Zhou, Q. and X. D. Chen. 2001. Immobilization of β -galactosidase on graphite surface by glutaraldehyde. *J. Food Eng.* **48**, 69-74.

초록 : Chitosan 담체에 고정화된 β -galactosidase에 의한 유당 분해 특성

강병철*

(동의대학교 화학공학과)

β -galactosidase를 공유결합으로 키토산 담체에 고정화하여 고정화 효소의 특성을 조사하였다. 또한 충전층 반응기에서 연속 조업을 실시하여 공정 최적화를 실시하였다. 키토산 담체에 대한 효소 고정화 효율은 최대 75%을 나타내었다. 고정화 효소에 대한 최적의 pH는 7.0이었고 최적의 온도는 50°C였다. pH와 온도의 실험 범위에서 고정화 효소가 자유 효소에 비해 넓은 분포를 보여 pH와 온도에 덜 민감하게 작용하였다. 충전층 반응기에서 고정화 효소의 운전에 대한 수학적 모델을 세우고 수치적으로 해를 구하였다. 투입되는 유당의 농도와 유량에 대해서 충전층 반응기의 출구에서 유당의 전환율을 측정하였다. 실험 결과를 경쟁적 저해 효소 반응식과 물질전달 저항을 고려한 수학적 모델의 결과와 비교하였다. 모델의 결과는 실험 결과를 5% 이내의 오차로 잘 예측하였다. 그리고 충전층 반응기의 길이에 따른 유당 전환율과 연속운전 시간에 따른 효소의 비활성화를 고려한 전환율을 모델로부터 예측하였다.