

## Enzymatic Hydrolysis of Egg Yolk Protein in Continuous Packed Column Operation

Byung Chul Kang, Sang Uk Lee

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

TEL: +82-51-890-1702, FAX: +82-51-890-1694

### Abstract

Enzymatic hydrolysis of egg yolk protein was carried out in continuous packed column reactor. Five supports for enzyme immobilization were evaluated in this study. We investigated the optimum operation variables - pH, temperature, and flow rate in continuous reactor operation.

### 서 론

계란은 고 영양가로 많은 식품산업에 사용되지만 난백(egg white)을 제외한 난황(egg yolk)만으로는 사용이 빈약한 실정이다. 난황내 당단백질에 존재하는 시알산 함유 올리고당은 항염증 작용, 바이러스 감염의 예방 및 학습기능의 향상 등을 목표로 한 의약품 및 기능성 식품의 소재로 수요가 증가되고 있다. 본 연구는 난황단백질의 가수분해를 통해서 기능성 식품재료를 개발하기 위해서 난황단백질 가수분해 효소를 고정화하였고 여러 담체에 대한 특성을 조사하였고, 충전탑에서 연속운전을 통해 pH, 온도 그리고 유량등의 운전변수에 대한 최적 조건을 조사하였다.

### 재료 및 방법

실험에 쓰인 난황단백질 가수분해효소는 *Orientase 22BF*(EC 3.4.21.62) 이며 Hankyu Bioindustry(Osaka, Japan)로부터 구입하여 사용하였다. 사용한 담체는 5가지 종류로서 Celite<sup>®</sup> R640은 Fluka(USA)에서, Dowex-1(strongly basic anion exchanger)와 Dowex-50W(HCR-W2, strongly acidic cation exchanger)는 Sigma Chemical Co.(USA)에서, Duolite A568는 Rohm and Haas Co.(Philadelphia, USA)에서 그리고 Silica gel 60은 Merck (Darmstadt, Germany)에서 구입하였다.

실험에 쓰인 난황단백질의 제조는 분말난황을 원료로 하여 다음과 같이 제조하

였다. 우선 난황에서 지질을 분리해내야 했는데 ethanol(주정, 95%)을 추출용매로 사용하였다. 난황과 ethanol의 비율을 1:5로 해서 40℃, 1시간 동안 stirred reactor에서 추출을 실시하여 여과시켰다. 아직 남아있는 여분의 지질을 2차로 추출하기 위해 여과된 난황과 ethanol을 1:3으로 해서 같은 온도로 30분간 stirred reactor에서 추출을 실시하였다. 그리고 여과된 난황을 50℃의 온도로 2시간 동안 dry oven에서 건조시켜 ethanol 성분을 없앴다.

효소의 고정화 방법은 다음과 같다. 0.1M Tris-HCl buffer solution(pH 9.0) 100mL에 고정화 담체 Celite<sup>®</sup> R640, Duolite A568, 그리고 Silicagel 60을 각 10g 씩 넣고 0.5g의 효소를 첨가한 다음 10분간 교반을 시키고 24 시간동안 4℃에서 정치고정화를 시켰다. 24 시간 후 각 담체를 같은 buffer와 증류수로 3번 세척하여 고정되지 않은 유리 효소를 완전히 제거한 후 실온에서 건조시켜 사용하였다.

난황단백질 가수분해 효소와 반응한 후 생성물의 아미노산 분석은 Lowry's method에 따라서 실시하였다.

연속공정에서는 난황단백질의 오염을 방지하기 위해 2℃로 유지될 수 있는 항온조에 reservoir를 설치하였다. 효소가 고정화된 담체는 30g을 정량해서 충전칼럼 효소 반응기에 충전시킨 후 peristaltic pump(Eyela MP-3, Japan)를 이용해서 30mL/hr의 속도로 난황단백질을 반응기 아래에서 위로 공급하였다. 연속흐름 공정에서는 온도(30, 40, 50℃), pH(5.0, 7.0, 9.0)를 달리하면서 초기 생성물부터 시작하여 5시간의 간격마다 sampling 하였으며 총 100시간 동안 21번의 흡광도를 측정하였다. 그리고 유량속도(30, 50, 90, 110mL/hr)를 변화시키면서 고정화된 효소의 활성을 측정해보았다. 이 실험에서는 60mL 간격으로 sampling 하였고, 총 1200mL를 실험하였다(Figure 1).

### 결과 및 고찰

pH와 온도에 대한 영향을 조사하기 위해 회분식공정을 통한 실험하였다. 세 종류의 담체를 비교했을 때 그림에서 보듯이 Duolite A568은 세 가지 온도 범위 모두에서 낮은 흡광도를 보였다. Silica gel 60은 40℃일 경우에 세 가지 담체 중에서 가장 높은 흡광도를 나타내지만 흡광도는 역시 온도가 낮을수록 더 높았다. Celite<sup>®</sup> R640은 40℃를 제외하고는 세 가지 담체 중에서 흡광도가 가장 높았다. 주목할 점은 다른 두 가지 담체는 30℃에서 흡광도가 가장 높았지만 Celite<sup>®</sup> R640은 40℃와 50℃에서 비슷하게 높은 흡광도를 나타냈다는 점이다(data not shown).

다음으로 이 회분식 공정을 토대로 충전칼럼 효소 반응기에 대한 고정화 실험

을 행하였다. 연속흐름 공정 실험에서는 처음부터 5시간 간격으로 sampling을 하여 흡광도를 측정하여 연속반응의 시간적 안정성과 pH의 변화에 따른 고정화 효소의 활성을 함께 연구하였다. 결과는 연속흐름 공정에서도 역시 회분식 공정과 같은 거의 비슷한 경향을 보였다. 결과는 예상대로 pH가 5.0일 때 전반적으로 높은 흡광도를 보였다. 세 가지 pH 범위 모두에서 Celite<sup>®</sup> R640과 Silica gel 60은 100시간동안 활성이 거의 줄어들지 않고 유지되고 있으며 상당히 안정적인 상태를 유지한다는 것을 알 수 있었다. Duolite A568의 경우 세 가지 pH 범위에서 흡광도가 0.5에서 많이 벗어나지 않고 있다는 것을 보았으며 pH 5.0에서는 90 시간대부터 급격한 흡광도 증가를 나타내었다. 3가지 담체 모두가 안정적인 흡광도를 유지하면서 100시간 동안 지금까지의 실험 중 가장 최적의 흡광도를 나타냈다. 온도를 30℃로 유지하고 pH를 변화시켰을 때 각 담체의 흡광도 차이를 자세히 비교하여 나타내었다. 이 그래프를 보면 회분식공정에서 보다는 연속흐름식공정에서 각 담체별 흡광도차이를 확실히 알 수가 있다(Figure 2).

충진칼럼 효소반응기를 사용하여 실험을 할 경우 칼럼내의 sintered glass filter에 완전히 용해되지 않은 찌꺼기 같은 것이 달라붙기도 쉽고, 또 충진된 bead층으로 인하여 기질과 생산물의 농도구배가 생기기 때문에 반응이 진행되면서 수용체 산물을 분해하고 교반식 반응기와 비교하면 상대적으로 반응이 원활하지 않을 수도 있다. 그런 이유로 인하여 시간대별로 약간 zig-zag 형태의 그래프 형태가 생기는데 이 영향은 향후 유동층식 충진반응기를 사용하여 최소화할 수 있을 것으로 사료된다.

회분식공정에 이은 연속흐름식공정에서 pH와 온도의 관계를 알아보았고 이 실험의 결과를 토대로 유속을 달리하여 실험하였다. 담체로 Silica gel 60을 선택하고 온도를 50℃와 30℃로 하였을 때, 온도에 따라서 유속의 변화가 고정화된 효소의 분해능력에 어떤 영향을 미치는지를 결과로서 나타내었다. 그 결과 *Orientase 22BF*가 고정화된 Silica gel 60의 경우 효소 활성을 나타내는데 난황단백질의 흐름 조건은 유속이 느린 30mL/hr의 경우가 가장 흡광도가 크게 나타났으며 빨라지면 빨라질수록 그 속도에 비례하여 낮아지는 것을 알 수 있었다. 그리고 pH의 영향도 앞선 실험에서의 결과들과 마찬가지로 보다 산성쪽에서 더 높은 흡광도를 나타내는 것을 알 수 있었다(Figure 3).

## References

1. Shi-Jun Ge, Hong Bai, Hong-Shen Yuan, Long-Xiang Zhang (1996), *J. Biotechnol.*

50, 161-170.

2. In-Su Lee, Doman Kim, Soo-Jin Heo, Moom-Su Kim, Ki-Young Lee, Seiya Chiba, and Atsuo Kimura (2000), *Korean J. Biotechnol. Bioneng.* **15**, 88-95.
3. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., and Randall R. J. (1951), *J. Biological Chemistry* **193**, 265.
4. L. R. Juneja, M. Kim (1997), *Egg Yolk Proteins*, in *Hen Eggs*, 57, CRC Press.
5. Yamamoto, T. (1996), *Method for Preparing Sialyloligosaccharide*, JP08099988(A).

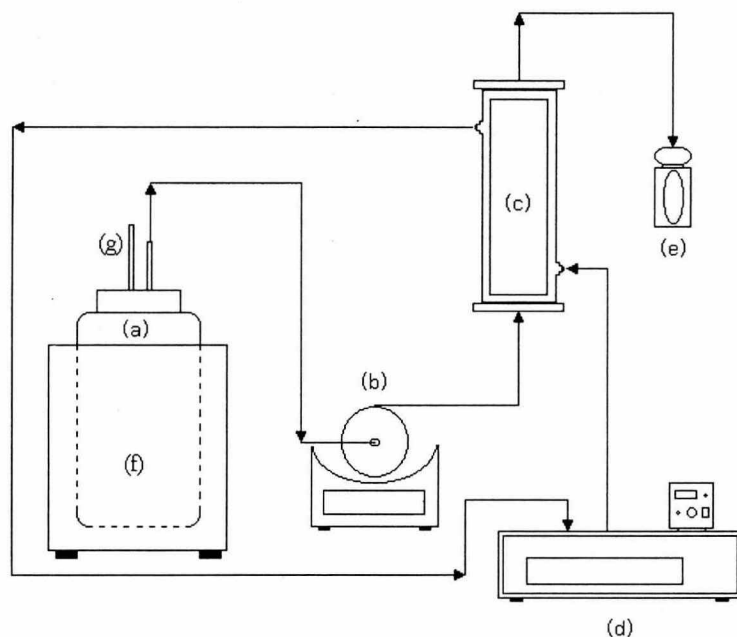


Figure 1. Schematic diagram for continuous flow process.

- |  |                           |
|--|---------------------------|
| (a) egg yolk protein solution reservoir, | (b) peristaltic pump,     |
| (c) packed column enzyme reactor,        | (d) water bath            |
| (e) cryogenic vial(sampling bottle)      | (f) cooler (g) air filter |

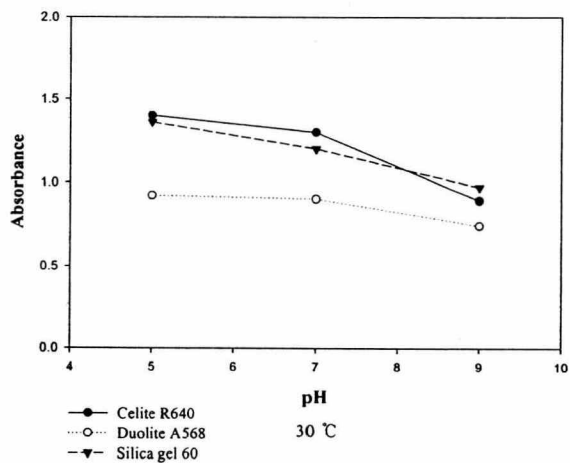


Figure 2. Effect of pH on the enzymatic hydrolysis of egg yolk protein in continuous operation.

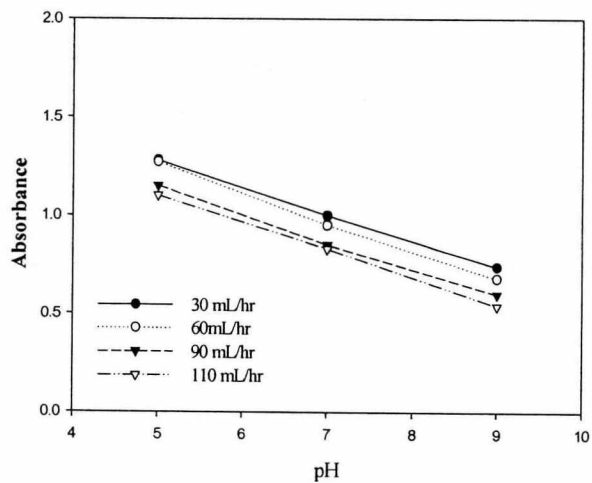


Figure 3. Effect of flow rate in enzymatic hydrolysis.