

연속식 중공사막 반응기를 이용한 각시가자미피 젤라틴의 가수분해

김세권 · 변희국 · 강태중* · 송대진**

부산수산대학교 화학과 · *여수수산대학 식품공학과 · **제주대학교 식품공학과

Enzymatic Hydrolysis of Yellowfin Sole Skin Gelatin in a Continuous Hollow Fiber Membrane Reactor

Se-Kwon KIM · Hee-Guk BYUN · Tae-Jung KANG* and Dae-Jin SONG**

Department of Chemistry, National Fisheries University of Pusan,

Pusan 608-737, Korea

**Department of Food Science and Technology, National Fisheries University of Yeosu,*

Yeosu 550-747, Korea

***Department of Food Science and Technology, Cheju National University,*

Cheju 690-120, Korea

A continuous hollow fiber membrane reactor(CHFMR) was developed and optimized for the production of yellowfin sole(*Limanda aspera*) skin gelatin hydrolysates using trypsin. The results were summarized as follows:

The K_m value of the CHFMR was 2.4 times higher than that of the batch reactor, indicating reduced enzyme affinity for the substrate. The K_2 value of the CHFMR was 8.5 times lower than that of the batch process, showing a significant reduction in trypsin activity in the CHFMR.

The optimum operating conditions for the CHFMR process were 55°C, pH 9.0, flux 7.79 ml/min, residence time 77min, and trypsin to substrate ratio, 0.01(w/w). After operating for 60min under the above conditions, 79% of the total amount of initial gelatin was hydrolysed. Enzyme leakage was observed through the 10,000 MWCO membrane after the 20min of reactor operation, while none occurred after 5hr. Total enzyme leakage was about 12.95% at 55°C for 5hrs. However, there was no apparent correlation between enzyme leakage and substrate hydrolysis. The membrane has a significant effect on trypsin activity loss for 60min of the CHFMR operation. The CHFMR operating with the membrane lost 34% of the initial activity versus a 23% loss of activity after 3hr in the continuous reactor lacking the hollow fiber membrane. The measurement of fouling property showed that relative flux reduction was 91% and flux recover rate was 92% at 10% substrate solution.

The productivity(378.85mg product/mg enzyme) of the CHFMR was more than 4 times higher than that of the batch reactor at 55°C.

서 론

현재 단백질의 가수분해물은 산 또는 알칼리분

해 가수분해물이 거의 산업적으로 이용되고 있다. 단백질을 산이나 알칼리로 처리할 경우 여러가지 문제가 야기되는데 산으로 가수분해할 경우 tryp-

tophan과 같은 필수아미노산과 cysteine이 분해 소실되며(Kinsella, 1979), 알칼리로 분해할 경우는 lysinoalanine[N-DL-(amino-2-carboxyethyl)-L-lysine]과 같은 독성물질이 생성되어 안전성 문제가 대두되고 있다(Deng 등, 1990).

근년 들어 고정화 효소를 이용한 단백질의 연속적 가수분해에 관한 연구가 이루어지고 있으나(Lasch 등, 1987; Kennedy 등, 1990; Sakai 등, 1991; Malcata 등, 1992) 고정화 방법이 까다롭고 고정화 하는데 입체장애에 의한 활성저하(10%~90%)가 일어난다(Cheryan and Mehaia, 1986). 그러나 본 연구에서 시도한 효소반응기와 증공사막 장치로 조합시킨 증공사막 반응기는 효소를 고정화시키지 않고 반복하여 이용할 수 있고 연속적으로 생성물을 분리하여 제품을 생산할 수 있다.

젤라틴의 가수분해에 관한 연구로는 Sattler 등(1973)은 소와 돼지피의 가수분해물이 meat emulsions에서 binder로서 이용될 수 있다고 하였고, Monsheimer와 Pfeleiderer(1981)는 피혁폐기물을 미생물 protease로 가수분해를 시도하였고, Appleman(1973)은 카제인 가수분해물과 젤라틴 가수분해물을 혼합하여 관능적으로나 영양적으로 우수한 음료를 만들 수 있었다고 보고하였다. 젤라틴과 다른 단백질을 동시에 가수분해시켰을 때 맛이 좋아졌다는 여러 보고가 있다(Schwille 등, 1977; Ney, 1979; Stanley, 1981). 또한 김 등(1991)은 어피의 효소적 가수분해물을 이용한 천연조미료 개발에 관한 연구, 강 등(1991)은 회분식에 의한 가자미피 젤라틴의 효소적 가수분해물의 제조조건에 대하여 보고하였다.

본 연구는 우리나라 수산가공공장에서 나오는 연간 약 30만톤의 어피가 일부 사료 또는 비료로 이용되거나 아니면 대부분 폐기되어 환경오염을 야기시키고 있으므로 이를 보다 효율적으로 이용하기 위한 일련의 연구로서 전보(강 등, 1991)에서 제조된 가자미피 젤라틴을 연속식 증공사막 반응기를 이용하여 연속적으로 가수분해하였다. 이 때의 회분식과 연속식에 있어서의 젤라틴에 대한 효소의 kinetics를 측정 비교하였으며, 연속식 증공사막 반응기장치에서의 효소활성 및 안정성에 미치는 인자와 젤라틴 가수분해 최적조건을 측정하여 가수분해물의 생산량을 높이기 위한 최적화 공정을 확립하였다.

재료 및 방법

1. 재 료

전보(강 등, 1992)에서 각시가자미(*Limanda aspera*) 껍질로부터 제조된 B-Type(알칼리 전처리) 젤라틴을 사용하였다. 실험에 사용된 효소는 Alcalase 0.6L(S.G.=1.25, NOVO Ind., Copenhagen/Denmark Batch No. PMN 0106 88-9), pepsin(800~2,500 units/mg solid, Sigma Co., No. P-7125), Protease(0.3 units/mg solid, Sigma Co., No. P-2143) 및 trypsin(10,000 BAAE units/mg solid, Sigma Co., No. T-8003)이었다.

2. 연속식 증공사막 반응기 장치

연속식 증공사막 반응기 장치는 Fig. 1에서와 같이 기질 공급장치, 반응혼합물 순환장치 및 pH 조절장치로 구성되어 있으며 반응기, 증공사(hollow fiber)막, 열판교반기(Nuova II, stir plate), pH 자동조절기(Cole-parmer Instrumental Co., Model 5652-20), 유량계, 압력조절밸브와 3개의 펌프(기질공급펌프, 반응혼합물의 순환펌프, 알칼리 공급펌프)로 설치하였다. 이들 각 장치를 효율적으로 작동하기 위해 다음과 같이 작동조건을 측정하였다.

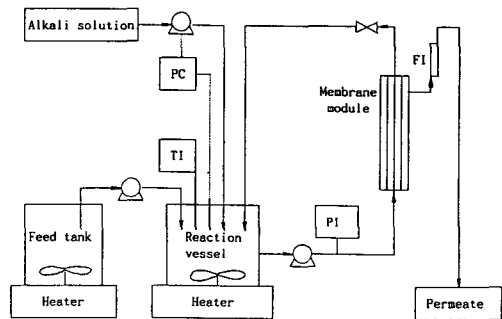


Fig. 1. Flow diagram of a continuous hollow fiber membrane reactor(CHFMR) for the hydrolysis of yellowfin sole skin gelatin.

FI: flowmeter indicator
PC: pH controller
PI: pressure indicator
TI: temperature indicator

1) pH 및 온도조절

연속식 증공사막 반응기에서 pH와 온도는 회분식에서 선정된 효소 trypsin의 최적조건인 pH 9.0과 온도 55℃로 유지하였다. 반응 혼합물의 pH는 자동 조절기를 이용하여 pH 9.0으로 고정시켜 pH가 9.0

으로 떨어지면 알칼리 공급펌프가 작동되므로써 3 N NaOH가 가해져 pH 9.0 ± 0.1 , 그리고 온도는 열 판교반기(Nuova II, stir plate)로 $55 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 로 조절되었으며, 자석막대를 반응기에 넣고 No. 5(교반속도)에 고정시켜 반응과정 중 일정하게 유지되도록 조절하였다.

2) 중공사막(Hollow fiber membrane)

중공사막(A/G Technology Co., Model UFP-10-L-4)은 가수분해물의 분자량이 10,000 이하만이 유출되는 10,000 MWCO를 사용하였다.

3) 유출속도의 조절

중공사막을 통한 유출속도는 유량계(Gilmont Instrument, Inc.)를 가수분해물의 출구에 설치하여 측정하였다. 유출속도는 중공사막을 통해 나오는 출구부분에 압력밸브를 설치하여 조절하였다.

4) 유출속도에 미치는 순환속도의 측정

순환속도가 유출속도에 미치는 영향을 측정하기 위해 반응기에 1% (w/w) 젤라틴 용액 500ml를 넣고 55°C , pH 9.0으로 조절한 다음 순환속도의 변화에 따른 유출속도를 측정하였다.

5) 유출속도에 미치는 압력의 측정

반응기에 각각 증류수와 1, 2, 4 및 6% 젤라틴 용액 500ml를 넣고 온도 55°C , pH 9.0으로 조절한 다음 순환속도를 860ml/min(Masterflex No. 5)로 일정하게 유지시켜 압력변화에 따른 유출속도를 측정하였다.

6) 기질공급과 반응부피 조절

기질공급탱크에 필요한 농도의 젤라틴 용액을 온도 55°C , pH 9.0으로 조절한 다음 기질공급펌프를 통하여 가수분해물의 유출속도와 동일한 속도로 반응기에 공급하였다. 이때 순환속도를 일정하게 고정시키고, 압력조절밸브만을 이용하여 유출속도를 조절하였다.

3. 회분식에서의 반응속도 상수(K_m , V_{max}) 측정

회분식에서 trypsin으로 젤라틴을 가수분해할 때 반응속도 상수를 측정하기 위해 먼저 기질농도 0.05, 0.1, 0.25, 1, 2 및 4% (w/w)인 기질용액 100 ml를 반응기에 넣고 55°C 로 가열한 다음 0.5N NaOH로 pH 9.0로 조절하였다. 이어서 반응기질에 대해 효소용액 0.05mg/ml를 가한 다음 15초 간격으로 2분간 계속 자동피펫으로 가수분해물 3ml를 취하여 20% 삼염화아세트산(TCA) 용액 3ml가 들어있는 시험관에 넣고 vortex mixer상에서 1분간

교반한 후 원심분리(1,500×g, 10min)하였다. 상층액 3ml를 취하여 가용성 질소량을 micro-Kjeldahl 법으로 정량하여 K_m 값 및 V_{max} 값을 계산하였다.

4. 연속식 중공사막 반응기에서의 반응속도 상수 측정

연속식 중공사막 반응기에서 trypsin에 의한 젤라틴 가수분해시 반응속도 상수(K_m , V_{max})의 측정은 0.5, 1, 2, 4 및 6% 젤라틴 용액 500ml를 만들어 반응기에 넣고 온도 55°C , pH 9.0으로 조절한 후 0.1mg/ml 효소량을 가하여 반응시켰다. 반응혼합물의 순환속도는 860ml/min으로 고정시켜 놓고 압력밸브를 이용하여 유출속도를 7.79ml/min으로 조절하였다. 막을 통과한 가수분해물을 10분 간격으로 60분 동안 3ml씩 분취하여 회분식 반응기에서와 같은 방법으로 질소량을 측정한 다음 초기속도(mgN/ml/min)를 계산하여 K_m 과 V_{max} 를 계산하였다.

5. 연속식 중공사막 반응기에서 젤라틴 가수분해 조건

1) 효소농도

연속식에서 1% 젤라틴 용액 500ml를 반응기에 넣고 55°C 로 가열하여 3N NaOH로 pH 9.0으로 조절하였다. 이 기질용액에 각 효소농도가 0.005, 0.01, 0.02, 0.04, 0.06, 0.1, 0.2 및 0.5mg/ml가 되도록 가한 후 10분 간격으로 120분간 3ml씩 취하여 20% 삼염화아세트산용액 3ml가 들어있는 시험관에 넣어 vortex mixer 상에서 1분간 교반한 다음 원심분리(1,500×g, 15min)한 상층액의 가용성 질소를 micro-Kjeldahl법에 의해 측정하여 가수분해도를 계산하였다.

2) 기질농도

젤라틴 농도를 각각 0.5, 1, 2, 4 및 6% 용액 500 ml를 반응기에 넣고 55°C 로 가열하여 3N NaOH 용액으로 pH 9.0으로 조절한 후 0.1mg/ml 효소량을 가한 다음 효소농도에서와 같은 방법으로 가용성 질소량을 측정하여 가수분해도를 계산하였다.

3) 유출량(Flux)

1% (w/v) 젤라틴 용액 500ml를 반응기에 넣고 55°C 로 가열하여 3N NaOH로 pH 9.0으로 조절한 후 0.1mg/ml 효소량을 가하고 유출속도를 1.03, 3.77, 7.79, 13.04 및 18.18ml/min로 각각 변화시키면서 가용성 질소량을 측정하여 가수분해도를 계산하였다.

4) 반응용액의 부피

1% 젤라틴 용액을 각각 400, 500, 600, 800 및 1,000ml를 반응기에 넣고 55℃로 가열한 후 3N NaOH로 pH 9.0으로 조절하였다. 각 용액에 효소량이 0.1mg/ml가 되도록 효소를 가하여 유출속도를 7.79ml/min으로 조절한 다음 10분 간격으로 120분 동안 3ml씩 분취하여 가수분해도를 계산하였다.

6. 연속식 증공사막 반응기 작동시 효소의 안정성에 미치는 인자

1) 온도의 영향

기계적 장치에 의한 효소활성 감소를 피하기 위하여 회분식에서 실시하였다. 즉, 회분식 반응기에 증류수 600ml를 넣고 온도 55℃, pH 9.0으로 조절한 후 trypsin 1mg/ml를 가하였다. 반응기로부터 효소액 1ml를 10분 간격으로 분취하여 55℃에서 3N NaOH로 pH 9.0으로 조절된 1% 젤라틴 현탁액 4ml와 혼합하여 10분 동안 반응시킨 후 20% (w/w) 삼염화아세트산용액 5ml를 가하여 반응을 종결시켰다. 효소의 활성은 삼염화아세트산용액 가용물에 존재하는 질소량을 측정하여 나타내었다.

2) 기계적인 전단응력에 의한 영향

증공사막 반응기 작동시 회분식에 비해 기계적인 장치가 효소활성에 미치는 영향을 측정하기 위해 막 반응기에 증류수 600ml를 넣고, 온도 55℃로 일정하게 유지하고 pH 9.0으로 조절한 다음 1mg/ml 효소를 가하여 유출속도 7.79ml/min, 순환속도 860ml/min로 작동하면서 반응기로부터 효소액 1ml를 10분 간격으로 분취하여 온도의 영향에서와 같은 방법으로 가용성 질소량을 측정하였다.

3) 증공사막에 의한 영향

상기와 동일한 조건하에서 막에 의한 효소의 손실을 측정하기 위하여 막 대신 Tygon tubing으로 교체하여 효소활성을 측정하였다.

7. 효소의 누출

증공사막 반응기에서 막을 통한 효소의 누출량을 측정하기 위해 젤라틴 가수분해 최적 조건하에서 행하였다. 즉, 반응기에 증류수 600ml를 넣고 pH 9.0, 온도 55℃로 조절한 다음 1mg/ml의 효소를 가한 후 순환속도 860ml/min, 유출속도 7.79ml/min로 조절하여 막을 통해 누출되는 효소 단백질량을 측정하였다. 반응기의 부피를 일정하게 유지하기 위해 유출속도와 동일한 속도로 온도 55℃, pH 9.0으로 조절된 증류수를 일정하게 공급해 주

었다.

8. Fouling 성질 측정

증공사막 반응기에서 젤라틴 기질에 대한 fouling 성질은 Capannelli 등(1990)의 방법에 따라 실시하였다. 즉, 반응기에 초기순수 600ml를 넣고 pH 9.0, 온도 55℃로 조절한 다음 순환속도를 860ml/min으로 일정하게 하여 압력을 10, 15 및 20psig로 변화시키면서 유출속도를 측정하였다. 그리고 기질용액의 농도를 1, 2, 4, 6 및 10%로 변화시키면서 상기의 조건에서 압력변화에 따른 각 기질용액의 유출속도를 측정하였다. 최종순수 유출속도는 온도 50℃의 증류수로 5회 세척한 다음 상기의 각 조건에 따른 유출속도를 측정하여 초기순수 유출속도에 대한 상대적인 유출속도의 감소비(Relative flux reduction, RFR)를 다음 식에 의해 계산하였다.

$$RFR(\%) = (1 - J_p/J_{w,o}) \times 100(\%)$$

$J_{w,o}$: 정상상태에서의 초기순수 유출속도

J_p : 젤라틴 용액에서의 유출속도

유출속도의 재생비(flux recovery ratio, FRR)

$$FRR(\%) = (J_{w,i}/J_{w,o}) \times 100(\%)$$

$J_{w,i}$: 젤라틴 용액이 막을 통과한 후 세척한 다음 순수의 최종 유출속도

9. 기질농도의 한계

많은 양의 가수분해물을 얻기 위하여 젤라틴 농도를 높여 상기의 최적조건 하에서 가수분해도를 측정하였다. 즉, 기질용액 10, 15, 20 및 25%를 600ml를 반응기에 각각 넣고 pH 9.0, 온도 55℃에서 각 기질에 대해 S/E=100(w/w)이 되도록 효소량을 가하여 10분 간격으로 120분간 유출되는 가수분해물의 가용성 질소량을 측정하여 가수분해도를 계산하였다.

10. 연속식 증공사막 반응기에서의 생성량 측정

연속식 증공사막 반응기를 이용하여 젤라틴 가수분해시 생성량을 측정하기 위하여 가수분해 최적조건하에서 실시하였다. 즉, 반응기에 10% 젤라틴 용액 600ml를 넣은 후 온도 55℃, pH 9.0으로 조절한 다음 1mg/ml 효소를 가하여 순환속도 860ml/min으로 고정시키고 압력조절밸브를 사용하여 유출속도 7.79ml/min으로 조절하였다. 반응과정 중 반응기의 부피를 일정하게 유지되도록 온도 55℃, pH 9.0으로 조절된 10% 젤라틴 용액을 유출속도와 동일한 속도로 기질을 공급하였다. 가수분해물의

생성량은 막을 통해 유출되는 가수분해물의 질소량을 측정하여 계산하였다.

$$P_1(mgN/mgE) = \frac{PJt}{E V}$$

$$P_c = \sum P_1$$

P_1 : 순간생성량

P : t 시간내 평균생성량(mgN/ml)

J : 유출속도(ml/min)

V : 반응물의 부피(ml)

E : 효소농도(mg/ml)

P_c : 시간변화에 따른 생성량의 합(mgN/mgE)

t : 시간(min)

결과 및 고찰

1. 효소 선별

각시가지미피(皮) 젤라틴에 대한 각종 단백질 분해효소의 활성을 비교 검토하기 위해 가수분해도를 측정한 결과는 Fig. 2와 같다. Fig. 2에 나타난

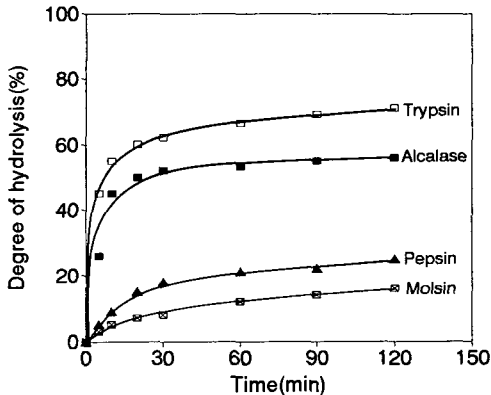


Fig. 2. Comparison of the degree of hydrolysis obtained with four proteases. Conditions include substrate as yellowfin sole skin gelatin, $S/E=200(w/w)$, temperature of $50^{\circ}C$ for Alcalase and molsin, $55^{\circ}C$ for trypsin and $40^{\circ}C$ for pepsin, pH 8 for Alcalase, trypsin and molsin and pH 2 for pepsin.

바와 같이 trypsin이 다른 단백질 분해효소보다 분해율이 높은 것으로 나타나 trypsin을 젤라틴 분해효소로 선정하였다.

김 등(1991b)은 pH-drop법을 이용한 1% 대구피 용액에 대한 collagenase, trypsin, pronase, collagenase/trypsin, collagenase/pronase의 활성을 비교한 결과, collagenase를 가하고 5분후에 pronase를 가

하였을 때 활성이 가장 좋다고 보고하였고, Bhumiratana 등(1977)은 trypsin이 어육단백질농축물(FPC)에 대해 chymotrypsin이나 papain보다 더 높은 반응성을 가진다고 보고한 바 있다.

2. 연속식 증공사막 반응기를 이용한 젤라틴의 가수분해

1) 증공사막 반응기 장치조건 설정

증공사막 반응기를 통한 유출속도는 가수분해물의 유출구에 유량계를 설치하여 측정하였다. 반응기에 증류수를 넣어 pH 9.0, $55^{\circ}C$ 로 조절한 다음 막을 통해 유출되는 양을 분당 10ml의 메스 실린더에 모아서 유량계 눈금(flow meter reading)에 대한 유출속도를 측정하였다. 유출속도에 대한 회귀직선방정식은 $J=0.46 \times F-4.033$ 로 유량계 눈금에 대한 유출속도를 구하는 식으로 나타내었다.

증공사막 반응기에서 순환속도를 조절하기 위해서 순환펌프 조절기를 이용하여 순환속도를 변화 시킴으로써 유출속도에 미치는 영향을 Fig. 3에 나

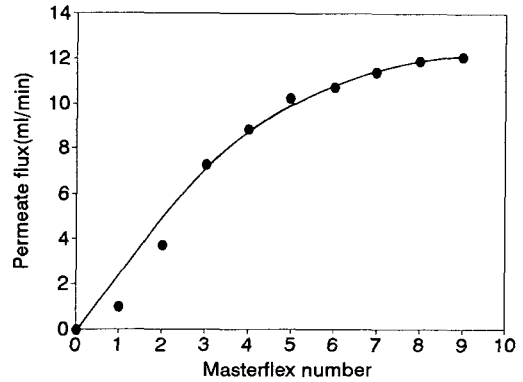


Fig. 3. Effect of recycling rate on permeate flux. ($P_r=7.5psig$, $S=1\%(w/v)$, pH 9.0, $55^{\circ}C$)

타내었다. 압력이 30psig가 되도록 압력밸브로 고정시킨 다음 순환펌프 조절기로 순환속도를 변화시켜 유출속도를 측정한 결과 Masterflex No. 5까지는 변화율을 보였다. 따라서 본 증공사막 반응기 장치 시스템에서는 Masterflex No. 5에서 작동하는 것이 가장 효율적이라 판단되었다.

유출속도에 미치는 압력의 영향은 Fig. 4에 나타내었다. 증류수를 대조구로 하여 각각의 젤라틴 농도에 대해 압력변화에 따른 유출속도를 나타낸 것으로서 일정하게 압력을 증가시킴에 따라 증류수의 유출속도는 비례적으로 증가하였으며, 각 기질의 농도가 증가함에 따라 압력변화에 따른 유출속도의

증가폭은 감소하였으며 1% 기질에 대해서는 7.5 psig 이상에서는 거의 일정한 유출속도를 나타내었다.

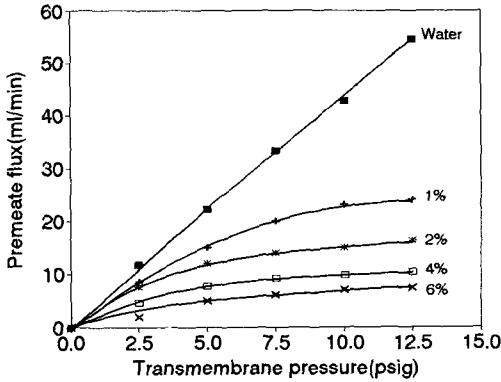


Fig. 4. Effect of transmembrane pressure on permeate flux vs yellowfin sole skin gelatin.(Recycling rate 860ml/min, pH 9.0, 55°C).

2) 회분식 반응기에서 젤라틴에 대한 trypsin의 반응속도 상수

회분식 반응기에서 젤라틴의 기질농도 변화에 따른 효소활성을 측정하여 Lineweaver-Burk 방법에 따라 plot한 결과는 Fig. 5와 같다. 낮은 기질농

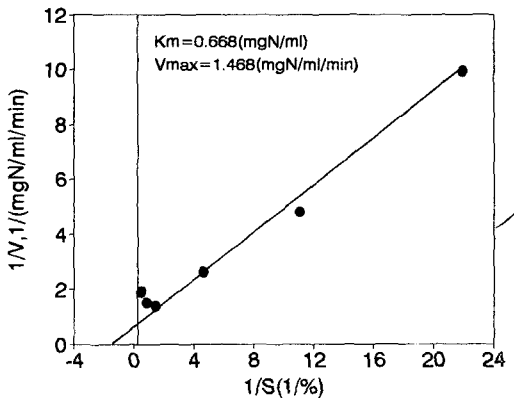


Fig. 5. Lineweaver-Burk plot for hydrolysis of yellowfin sole skin gelatin with trypsin in a batch reactor, pH=9, 55°C, E=0.05mg/ml.

도에서 계산된 trypsin의 젤라틴에 대한 K_m 및 V_{max} 값은 각각 0.668mgN/ml(0.371%), 1.468mgN/ml/min였다. 김 등(1991b)은 pronase에 의한 대구피 가수분해시 K_m 및 V_{max} 값은 각각 1.82mgN/ml, 0.06 mgN/ml/min였고, Alcalase에 의한 젤라틴의 가수분해의 경우(김 등, 1991a), K_m 과 V_{max} 값은 각각

0.377mgN/ml(0.209%), 0.562mgN/ml/min였다고 보고하였다. Svendsen(1976)은 subtilisin carlsberg로 pH 8.0, 온도 30°C에서 젤라틴을 가수분해시 K_m 값은 0.5% 근방이라고 보고한 바 있다.

3) 연속식 중공사막 반응기에서 젤라틴에 대한 trypsin의 반응속도 상수

연속식 중공사막 반응기에서 반응속도 상수를 측정하기 위하여 각 기질농도를 시간변화에 따른 생성량을 측정한 결과는 Fig. 6와 같다. 기질농도가 높을수록 정상상태(steady state)에 도달하는 시간이 길었으며 기질농도 6%일 때 반응시간 30분이 지나 정상상태에 도달하였다. 각각의 기질농도에 대한 기울기를 측정하여 Lineweaver-Burk plot하면 Fig. 7과 같다. Michaelis-Menten 상수 K_m 값 및 V_{max} 값은 각각 1.162mgN/ml 및 0.347mgN/min였으

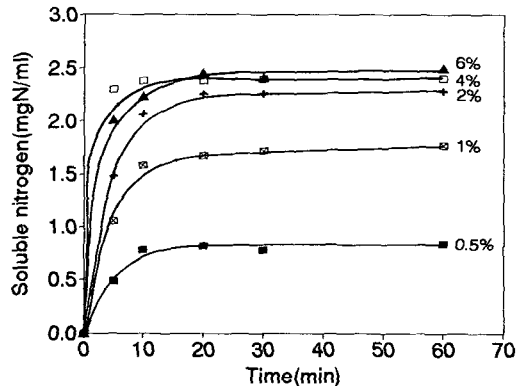


Fig. 6. CHFMR kinetics-effect of substrate concentration on the hydrolysis of yellowfin sole skin gelatin with trypsin in CHFMR.(pH 9.0, 55°C, E=0.1mg/ml, J=7.79ml/min, V=500ml, Q=860ml/min)

며, K_m 값보다 낮은 기질농도에서는 반응속도가 V_{max} 값보다 매우 낮기 때문에 촉매능을 잃게 되고 K_m 값보다 높은 기질농도에서는 반응혼합물 중에 고형물의 증가를 초래하였다고 보고하였다.

Bliss와 Hultin(1977)은 pronase로 casein의 분해시 K_m 값이 1.67%였다고 보고하였고, Alder-Nissen 등(1986)은 Alcalase로 casein의 가수분해시 한외여과막 반응기를 효율적으로 사용하기 위해서는 K_m 값이 0.11~0.5%였다고 보고하였다. 또한, Svendsen(1976)과 Alford 등(1984)은 a-chymotrypsin으로 casein의 가수분해시 K_m 값이 각각 0.1~0.2% 및 0.26%였다고 보고한 바 있다.

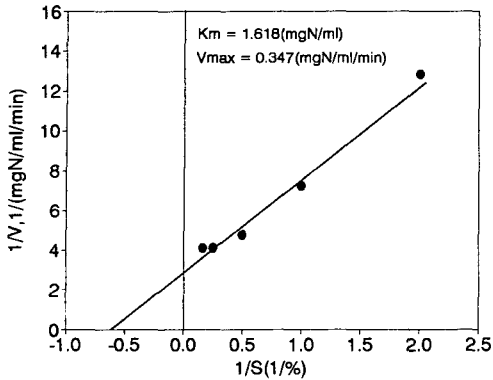


Fig. 7. Lineweaver-Burk plot for hydrolysis of yellowfin sole skin gelatin with trypsin in CHFMR.(pH 9.0, 55 °C, E=0.1mg/ml, J=7.79ml/min, Q=860ml/min, V=500ml)

회분식과 연속식에서의 Michaelis-Menten 상수는 Table 1에 나타내었다. 연속식에서 K_m 값은 회분식에 비해 2.4배 정도 큰 반면 V_{max} , K_2 값은 매우 작았다. 이와 같이 연속식에서 효소와 기질의 친화력이 낮게 나타나는 것은 효소의 일부가 누출되었거나 막표면에 효소의 흡착으로 인한 활성 저하, 반응 혼합물의 순환에 의한 기계적인 전단응력(shearing forces) 등 여러 인자에 기인되는 것으로 판단된다 (Mannheim, 1988).

연속식에서 V_{max} 와 K_2 값이 회분식에 비해 각각 4.2 및 8.5배 정도 낮은 것은 위에서 설명한 원인들에 의해 증공사막 반응기에서 trypsin의 활성이 감소되는 것으로 판단된다. 기질에 대한 효소의 친화도의 척도로서 V_{max}/K_m 비가 클수록 기질과 효소의 친화도는 크게 되는데 회분식에 비해 증공사막 반응기에서 V_{max}/K_m 비가 10배 정도 낮게 나타났다.

Table 1. Summary of kinetic parameters for batch and continuous hollow fiber membrane(CHFM) reactors

Kinetic constants	Batch	CHFM
K_m (mgN/ml)	0.668	1.618
(%)	(0.371)	(0.898)
V_{max} (mgN/ml/min)	1.468	0.347
$*K_2$ (min) ⁻¹	29.360	3.470
V_{max}/K_m (min) ⁻¹	2.198	0.214
**R²	0.980	0.990

* $K_2 = V_{max}/E$ (min)⁻¹

** R²: Relative coefficient

3. 연속식 증공사막 반응기에서의 젤라틴 가수분해 조건

1) 효소농도

연속식 증공사막 반응기에서 젤라틴 1% 용액에 효소농도를 변화시켜 각각의 효소가 작용하여 정상상태에 도달하였을 때의 가수분해도를 측정 한 결과는 Fig. 8과 같다. 1% 기질에 대해 효소농도가 0.1mg/ml까지는 가수분해도가 급격히 증가하다가 그 이상으로 효소의 농도가 증가하여도 가수분해도는 72%로 거의 일정하였다. 따라서 효소농도는 0.1mg/ml(S/E=100)가 적합하다고 판단되었다.

Edward 등(1980)은 0.5% 소맥 불용성단백질에 효소를 S/E=250(w/w)되게 가하여 가수분해시킨 결과, 가수분해도는 55%였다고 하였으며, Belinda 등(1986)은 Alcalase로 대두단백질을 가수분해시킬 때 기질에 대해 효소농도가 2.5%에서 가수분해도가 79.0%였다고 보고하였다. Payne 등(1978)은 한 외여과막 반응기에서 녹엽단백질을 trypsin 농도가 S/E=500(w/w)되게 가하여 4시간 가수분해시켰을 때 가수분해도는 97%였다고 보고한 바 있다.

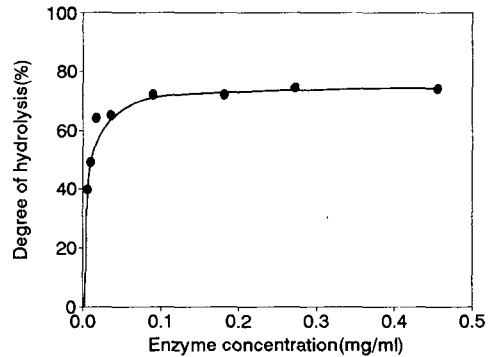


Fig. 8. Effect of enzyme concentration on the hydrolysis of yellowfin sole skin gelatin with trypsin in CHFMR.(pH 9.0, 55 °C, S₀=1%(w/v), J=7.79ml/min, V=500ml)

2) 기질농도

연속식 증공사막 반응기에서 일정한 효소량에 대해서 기질농도의 변화에 따른 가수분해도는 Fig. 9와 같다. 기질 1%(w/v) 이하의 젤라틴에서는 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 중공사막 반응기에서는 나타나지 않았기 때문이라고 생각된다.

기질대 효소비(S/E, w/w)의 변화에 따른 가수분해도는 Fig. 10에서와 같이 기질대 효소비가 증가할수록 가수분해는 감소하는 경향을 보였으며, 1,000(w/w)에서 20(w/w)으로 낮아졌을 때 가수분해는 25% 정도 높았고, 100(w/w)에서는 가수분해도가 72%였다. 그러나 그 이하에서도 가수분해도는 거의 같았으므로 본 실험에서는 기질대 효소비는 100(w/w)으로 하였다. Deeslie와 Cheryan(1980)은 대두단백질을 pronase로 연속적 가수분해시 최적 E/S비는 1/9와 1/16사이였다고 보고한 바 있다.

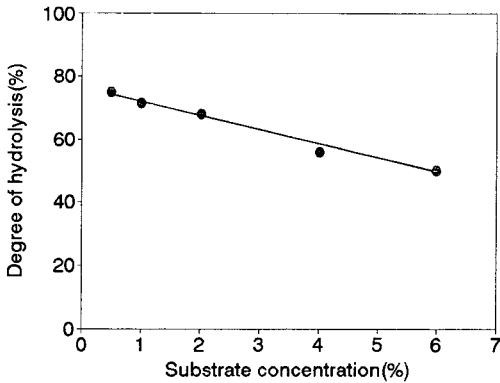


Fig. 9. Effect of substrate concentration on the hydrolysis of yellowfin sole skin gelatin with trypsin in CHFMR. (pH 9.0, 55°C, E=0.1mg/ml, V=500ml)

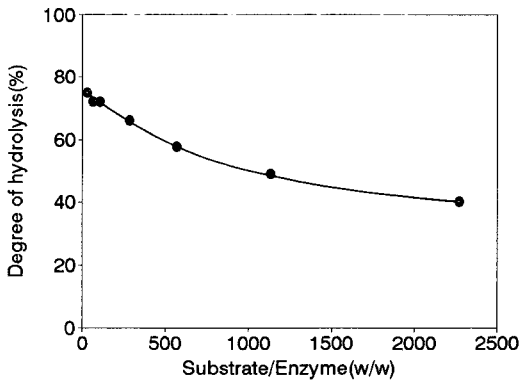


Fig. 10. Effect of substrate to enzyme ratio(w/w) on the hydrolysis of yellowfin sole skin gelatin with trypsin in CHFMR. (pH 9.0, 55°C, J=7.79ml/min, V=500ml)

3) 반응부피 및 유출속도

연속식 중공사막 반응기에서 젤라틴 가수분해시 반응기의 부피에 의한 가수분해도를 반응부피를 400ml에서 1,000ml까지 변화시켜 측정된 결과 Fig. 11과 같다. 반응혼합물의 부피가 400ml 이하에서는 기계적 장치의 제한으로 재순환이 불가능하였으며, 부피가 600ml 이상에서는 가수분해도가 79%로 거의 일정하였다. 이러한 반응부피의 영향은 일정한 유출속도에서 효소와 기질이 접촉하여 반응할 수 있는 시간적 차이에 의해 결정되는 것으로 추측된다.

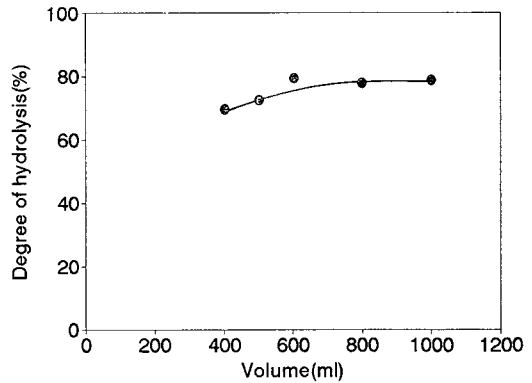


Fig. 11. Effect of reactor volume on the hydrolysis of yellowfin sole skin gelatin with trypsin in CHFMR. (pH 9.0, 55°C, S=1%(w/v), E=0.1mg/ml, J=7.79ml/min)

유출속도 변화에 따른 기질의 가수분해도를 측정된 결과는 Fig. 12와 같다. 유출속도가 높을수록 정상상태에의 도달은 빨랐지만 가수분해도는 다소 감소하는 경향을 보였다. 이 결과는 반응부피의 영향과 동일한 원인으로 빠른 유출속도로 인해 반응용기에서 기질과 효소가 작용할 시간이 감소되기 때문이라고 생각된다. 따라서 본 실험에서는 유출속도를 가수분해도가 75%인 7.79ml/min으로 정하였다.

4) 잔류시간

반응기내에서 기질과 효소가 반응할 수 있는 접촉시간이며 정상상태에서 반응기내의 효소와 기질이 반응할 수 있는 잔류시간 변화에 따른 가수분해도를 Fig. 13에 나타내었다. Fig. 13에서와 같이 잔류시간이 10분에서 75분까지 증가함에 따라 가수분해도가 50%에서 74%로 급격히 증가하다가 그 이후로는 잔류시간이 증가되어도 가수분해도는

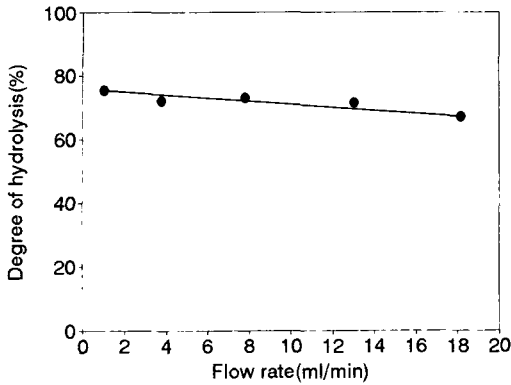


Fig. 12. Effect of flow rate on the hydrolysis of yellowfin sole skin gelatin with trypsin in CHFMR. (pH 9.0, 55°C, S₀=1%(w/v), E=0.1mg/ml, V=600ml)

거의 일정하였다. 유출속도가 7.79ml/min에서 잔류시간은 77분이었으며 이때의 기질의 가수분해도는 75%였다.

김 등(1991a)은 Alcalase로 대구피젤라틴을 가수분해시 유출속도가 7.31ml/min에서 잔류시간 82분이 적합하다고 보고한 바 있다. Deeslie 등(1980)은 대두단백질을 pronase로 가수분해시 17분에서 34분으로 잔류시간이 길수록 높은 생성량을 얻을 수 있지만 정상 상태에 도달되는 시간은 길어지고 최적잔류시간은 180분이었으며 잔류시간이 그 이상일 때는 경제적인 관점에서 실용적이지 못하다고 보고하였다.

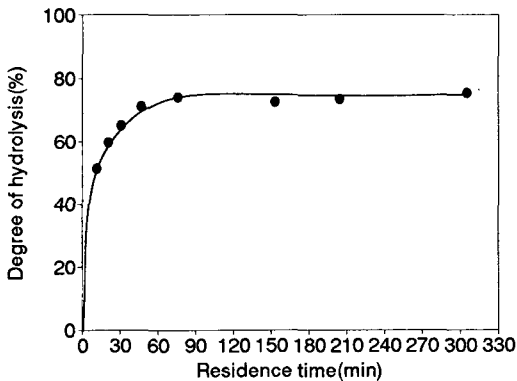


Fig. 13. Effect of residence time on the hydrolysis of yellowfin sole skin gelatin with trypsin in CHFMR. (pH 9.0, 55°C, S=1%(w/v), E=0.1 mg/ml)

4. 연속식 증공사막 반응기에서의 효소 안정성에 미치는 인자

1) 효소의 열안정성

효소의 안정성에 미치는 영향 중 온도에 의한 영향만을 알아보기 위해 회분식 반응기에서 trypsin 효소에 대한 열안정성을 측정한 결과는 Fig. 14에 나타내었다. Fig. 14에서와 같이 효소안정성은 55°C에서는 40분까지 초기효소활성에 비해 급격히 감소하다가 2시간 이후 50% 정도까지 감소하였으나 25°C에서는 시간 변화에 따라 효소활성이 완만하게 감소하였으며, 2시간 후로는 20% 정도의 감소율을 나타내었다.

Mannheim(1990)은 회분식반응기에서 Alcalase의 안정성에 미치는 온도(50°C와 37°C)의 영향을 측정한 결과, 반응 2시간후 Alcalase의 안정성은 50°C에서 초기활성의 75% 손실되었으며, 37°C에서는 40%가 손실되었다고 보고하였다.

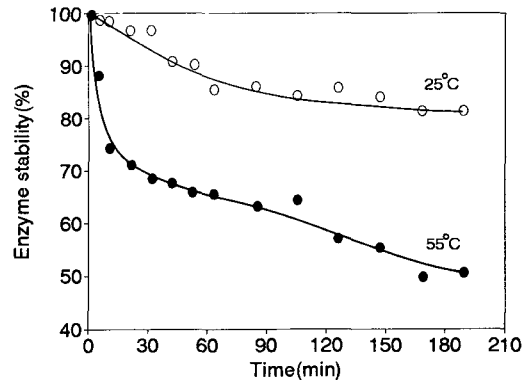


Fig. 14. Effect of temperature on trypsin stability.

2) 기계적인 전단응력에 의한 영향

회분식에서 나타난 결과에 따라 25°C에서 수용액 중에서 trypsin의 활성에 대한 기계적인 전단응력 및 막에 의한 영향을 알아보기 위해 초기 활성을 측정한 결과는 각각 Fig. 15, Fig. 16에 나타내었다. Fig. 15에서와 같이 회분식 반응기에 비해 연속식 증공사막 반응기에서 기계적인 전단응력에 의한 영향은 최초 1시간까지 효소활성이 27% 감소하였으며 1시간 이후로는 완만하게 감소하였다.

온도에 의한 안정성에 비해 기계적인 전단응력에 의한 효소의 안정성에 미치는 영향이 다소 적은 것으로 나타났다. 기계적인 전단응력과 증공사막 반응기의 영향 중에서 막에 의한 영향만을 정확하

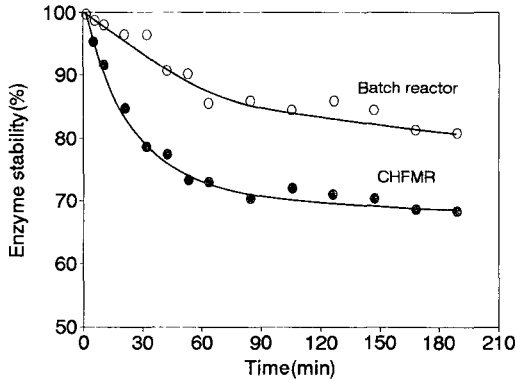


Fig. 15. Effect of membrane and mechanical shear rate on trypsin stability.

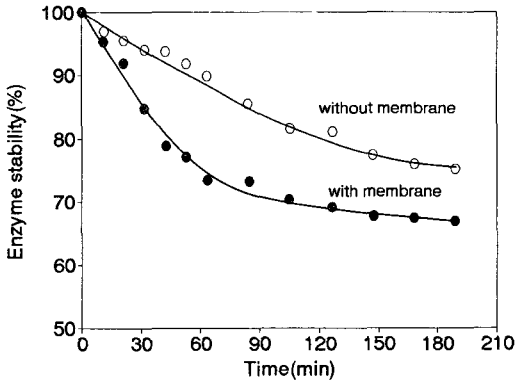


Fig. 16. Effect of membrane on trypsin stability.

게 측정하기 위하여 막 대신에 Tygon tube로 대체시킨 장치를 대조구로 사용하였다. 연속식 중공사막 반응기는 작동시간 1시간까지 trypsin의 활성이 급격히 저하하였으나 1시간 이후에는 거의 활성 저하가 나타나지 않았다. 작동시간 3시간에서 초기 속도의 34%가 저하하였다. 그러나 막을 제거시킨 반응기에서는 trypsin의 활성이 반응시간이 길어짐에 따라 서서히 감소되었으며 반응시간 3시간에서 23%의 활성저하를 나타내었다. 중공사막은 trypsin을 흡착하거나 활성부위에 영향을 미치는 것으로 판단된다. 효소활성에 대한 막의 영향에 대하여 Cheryan(1986)의 보고가 있다. 막에 의한 영향과 비교하였을 때 10% 정도 효소안정성에 차이가 있었다.

Mannheim과 Cheryan(1990)은 한외여과막 반응기에서 Alcalase의 활성에 미치는 막의 영향을 측정된 결과, 막이 있을 때 60분에서 Alcalase 초기활성의 85%가 손실되었으며 막을 제거시켰을 때는

30% 효소활성이 감소되었다고 보고하였으나 본 실험에서는 이에 비해 막에 의한 효소활성의 저하가 낮았다.

3) 효소의 누출

중공사막 반응기의 최적조건 하에서 막을 통해 누출되는 효소량을 측정된 결과는 Fig. 17과 같다. 중공사막 반응기 작동시간 20분에서 0.085mg/ml로 가장 많이 누출되었으며, 그 이후 3시간까지 급격히 감소하다가 5시간에는 거의 누출되지 않았다. 이때의 전체 효소누출량은 12.95%였다. Mannheim(1989)은 막 반응기를 이용하여 Alcalase로 casein을 가수분해시 효소의 누출량을 측정된 결과, 온도 50℃와 37℃에서 각각 효소의 누출량은 57% 및 52%였으며, 반응기 조작 90분 이내의 유출용액에서만 단백질 분해활성을 측정할 수 있었다고 하였으며, 초기 단계에서 누출된 효소는 잔류효소의 활성에 크게 영향을 미치지 않는다고 보고한 바 있다. 김 등(1991a)은 효소누출과 반응기 안정성간에는 직접적인 상호관계는 나타나지 않아 초기 단계에서 누출된 효소는 잔류효소의 활성에 크게 영향을 미치지 않는다고 보고하였다.

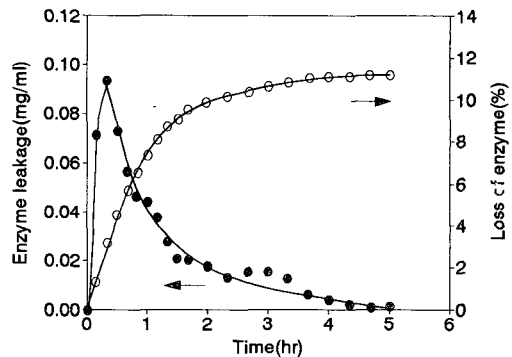


Fig. 17. Leakage of trypsin in the CHFMR at 55°C. (pH 9.0, E=1mg/ml, J=7.79ml/min, V=600ml, Q=860ml/min)

4) Fouling 성질

젤라틴 용액과 순수의 상대적인 투과성에 영향을 주는 fouling 성질을 측정된 결과는 Fig. 18에 나타내었다. Fig. 18에서와 같이 순수에 비해 기질이 증가함에 따라 상대적인 유출속도 감소율(RFR)이 증가하였으며 10% 기질용액에서는 RFR(%)값이 91%였다. 또한 기질농도의 변화에 따라 압력을 달리하였을 때 기질농도가 6%까지는 기질농도가

높을수록 RFR(%)도 증가하지만 기질농도가 10%에서는 농도에 관계없이 RFR(%)값이 일정하여 압력에 의한 영향은 받지 않았다. 기질농도가 6% 이하에서는 RFR값의 증가폭이 컸지만 기질농도가 높아짐에 따라 RFR값의 증가폭은 감소되었으며, 전체 RFR값은 매우 높은 것으로 나타났는데 이같은 결과는 Cheryan과 Chiang(1984)이 보고한 미농축 탈지유의 유출속도의 절대값은 농축된 탈지유(3 or 5 fold)에 비해 훨씬 낮았지만 농축된 탈지유의 유출속도는 미농축 탈지유의 그것에 비해 거의 flux가 감소된다는 결과와 일치하였다.

유출속도 재생율은(FRR)은 Fig. 18에서와 같이 기질농도가 증가됨에 따라 유출속도 재생율은 다소 감소되는 경향을 보였으며, 10% 젤라틴 용액에서 재생율이 92%로 비교적 높게 나타내었는데 이는 기질인 젤라틴이 수용성이므로 수세외에 막세척에 의해 막투과성의 거의 재생시킬 수 있을 것으로 판단된다.

막의 fouling 성질에 크게 영향을 미치는 인자로서는 온도, 유출속도, 압력 및 공급기질의 농도 등을 들 수 있으며 특히, 막 fouling 성질에 크게 영향을 미치는 것은 막의 화학적 성질과 막과 용질의 상호작용을 들 수 있다(Cheryan, 1986). Capannelli 등(1990)은 막의 재질에 따라 순수과 0.1% (w/v)의 유장단백질(whey protein)의 fouling 성질을 측정된 결과, PF(polyvinylidene fluoride)재질인 막의 RFR(%)값 및 FRR(%)값은 각각 82.6~87.0% 및 87.0~99%였으며, PS(polysulfone)재질인 막의 경우는 각각 63.0~70.3% 및 51.8~74.5%로 PS막 재질보다 PF막 재질이 더 좋은 anti-fouling 성질을 나타내었으며 막재질의 친수성이 높을 때 anti-fouling 성질이 양호하다고 보고한 바 있다.

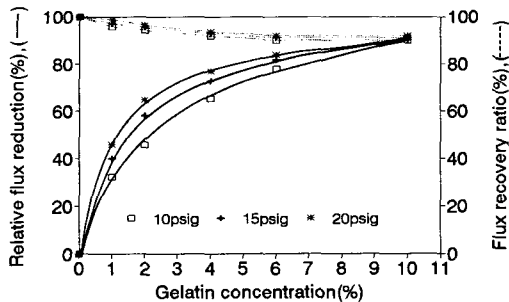


Fig. 18. Fouling properties with pure water and yellowfin sole skin gelatin solution fluxes in UFP-10 membrane.(conditions: pH 9.0, 55 °C, recycling rate=860ml/min)

5) 고 기질농도의 한계

연속식 증공사막 반응기에서 최적가수분해 조건인 pH 9.0, 온도 55 °C, 유출속도, 7.79ml/min, 부피 600ml, S/E=100(w/w)에서 기질농도를 10, 15, 20 및 25%로 변화시켜 가수분해도를 측정된 결과는 Fig. 19와 같다. 기질농도 10%에서 반응시간 40분까지 가수분해도는 75%로 증가하였으며, 2시간 반응시킨 후 가수분해도는 89%였다. 기질농도 15, 20 및 25%에서는 반응시간 40분까지는 가수분해도가 60%로 증가하였지만 그 이후로는 거의 일정하였다. 일반적으로 효소에 의한 가수분해시 기질농도는 1~5% 범위로 보고(Mennheim, 1988)되어 있으므로 본 연구에서의 기질농도 10%는 매우 높은 기질농도임을 알 수 있다.

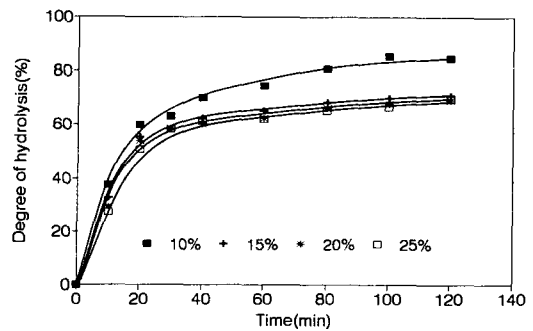


Fig. 19. Comparison of the hydrolysis of CHFMR with substrate concentration at 55 °C, pH 9.0 (conditions: S/E=100(w/w), flow rate 7.79 ml/min, volume 600ml).

5. 생산량(Productivity)

회분식과 연속식의 최적가수분해 조건하에서 부피대체율에 대한 생산량은 Fig. 20에 나타내었다. Fig. 20에서와 같이 부피대체율이 7배까지는 생산량이 비례적으로 증가하였지만 그 이후로는 생산량이 완만하게 증가하는 경향을 나타내었다. 이와 같이 부피대체율이 증가함에 따라 생성량이 완만하게 증가하는 것은 반응기내에서 효소의 누출, 증공사막 반응기에 의한 기계적인 전단응력, 막 등에 의해 효소의 활성이 저하되기 때문이라 생각된다. 이 문제는 반응기 작동 후 생산량의 감소가 나타나는 부피대체율에서 효소를 가해줌으로써 해결할 수 있을 것으로 생각된다.

회분식에서 생산량은 부피변화에 무관하며 효소로 반응시키면서 정상상태에 도달하였을 때 생산

량은 효소 mg 당 가수분해율이 $87.58mg$ 였다. 이에 비해 연속식에서는 효소 mg 당 가수분해물의 생산량이 $378.85mg$ 으로 회분식의 생산량에 비해 4배 이상이었다. 연속식은 기질에 대한 효소의 친화력이 회분식에 비해 낮았지만 효소를 재순환시켜 사용함으로써 효소당 생산량은 회분식에 비해 월등히 높았다.

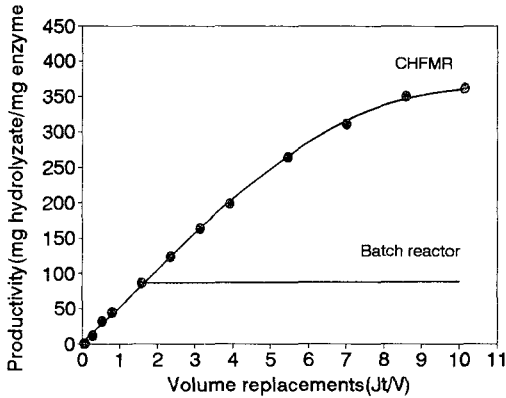


Fig. 20. Productivity of CHFMR and batch reactor at $55^{\circ}C$. CHFMR conditions: $S=10\%$, $E=1mg/ml$, flow rate $7.79ml/min$, volume $600ml$.

요 약

어류 가공시 부산물로 얻어지는 어피를 효율적으로 이용하고자 알칼리 전처리법으로 각시가자미피(皮)로부터 제조된 젤라틴을 시료로 하여 연속식 증공사막 반응기를 이용한 젤라틴의 가수분해 최적조건과 증공사막 반응기 장치에서의 효소활성 및 안정성에 미치는 인자에 대하여 검토하였다.

연속식 증공사막 반응기에서 가수분해조건을 보면 효소농도는 $0.1mg/ml$ 이상에서는 가수분해율이 거의 72% 이상이었다. 기질농도 1% 이하에서는 70% 이상의 가수분해율을 나타내었으며, 기질농도가 증가함에 따라 가수분해율이 약간 감소하는 경향이었다. $S/E=100(w/w)$ 이하에서는 거의 72% 이상의 가수분해율을 나타내었다. 유출속도가 $7.79ml/min$ 일 때 잔류시간은 77분이었으며, 이때의 가수분해율은 79%였다.

증공사막 반응기 장치의 최적조건은 1% 기질에 대해 효소농도 $0.1mg/ml$, 유출속도 $7.79ml/min$, 잔류시간 77분, 반응온도 $55^{\circ}C$ 에서 기질의 가수분해율은 반응시간 1시간 부근에서 최대값을 나타내었

다.

효소활성은 온도 $55^{\circ}C$ 에서 50%, $25^{\circ}C$ 에서 20%가 감소되었으며, 막에 의한 효소활성은 3시간 후에 34% 감소하였다. 막을 통한 효소의 누출은 작동시간 20분에서 최대였으며 작동시간 5시간 이후에는 거의 효소가 누출되지 않았으며, 전체 효소량 중 효소누출량은 12.95%이었다.

막의 fouling 성질은 10% (w/v) 기질용액에서 순수에 대한 상대적인 유출속도 감소율(RFR)은 91%였으며 유출속도 재생율은 92%였다. 높은 기질농도 10%에서는 가수분해도가 89%였으며, 그 이상의 기질농도에서는 75%였다.

젤라틴에 대한 trypsin의 반응속도 상수인 K_m 및 V_{max} 는 회분식에서 각각 $0.668mgN/ml$, $1.468mgN/ml/min$ 였으나, 연속식에서는 이들의 값이 각각 $1.618mgN/ml$, $0.347mgN/ml/min$ 였다. 연속식에서 K_m 값은 $1.618mgN/ml$ 으로 회분식의 $0.668mgN/ml$ 에 비해 2.4배 정도 큰 반면 V_{max} , K_2 는 매우 작았다.

회분식과 연속식에서 최적조건하에서 젤라틴을 가수분해하였을 때 효소 mg 당 생산하는 가수분해물은 각각 $87.58mg$ 및 $378.85mg$ 으로 회분식에 비해 생산량이 4배 이상이었다.

참 고 문 헌

- Adler-Nissen, J. 1986. Relationship of structure to taste of peptides and peptide mixtures. In: *Protein tailoring and reagents for food and medical uses* (R. E. Feeney, J. R. Whitaker, eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, 97~122.
- Alford, E. S., V. Piriyan, C. W. Dill, C. R. Young, R. L. Richter and W. A., Landmann. 1984. Effect of succinylation on proteolysis of food protein. *J. Food Sci.* 49, 614~616.
- Appleman, M. L. 1973. High protein fruit-type beverage and processing therefore. *Br. Patent 1, 308,690* (to Daylin Laboratories, Inc. U. S. A.).
- Belinda, V. C., N. Shuryo, D. P. William and B. Thomas. 1986. Protein hydrolysates for reducing water activity in meat products. *J. Food Sci.* 51, 1158~1161.
- Bhumiratana, S., C. G. Hill and C. H. Amundson. 1977. Enzymatic solubilization of fish protein concentrate in membrane reactors. *J. Food Sci.* 42, 1016~1022.

- Bliss, F. M. and H. O. Hultin. 1977. Enzyme inactivation by an immobilized protease in a plug flow reactor. *J. Food Sci.* 42, 425.
- Capannelli, G., A. Bottino, V. Gekas and G. Tragarth. 1990. Protein fouling behaviour of ultrafiltration membranes prepared with varying degrees of hydrophilicity. *Process Biochem. Int.*, December, 222~224.
- Cheryan, M. 1986. Ultrafiltration Handbook. Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, Basel.
- Deeslie, W. D. 1980. Enzymatic modification of soy proteins in a ultrafiltration-enzyme reactor system. *Ph. D., Thesis, Univ. of Illinois Urbana-Champaign.*
- Deeslie, W. D. and M. Cheryan. 1980. Continuous enzymatic modification of proteins in an ultrafiltration reactor. *J. Food Sci.* 46, 1035~1042.
- Edwards, C. A. and W. K. O'Brien, JR. 1980. Modified assay for determination of hydroxyproline in a tissue hydrolyzate. *Clinica Chimica Acta.* 104, 161~167.
- Gildberg, A. and J. Raa. 1979. Solubility and enzymatic solubilization of muscle and skin of capelin at different pH and temperature. *Biochem. Physiol.* 63, 309~315.
- Kennedy, J. F., E. H. M. Melo and K. Jumel. 1990. Immobilized enzymes and cells. *Chem. Eng. Prog.* 86, 81~89.
- Lasch, J., R. Koelsch and K. Kretschmer. 1987. Continuous production of protein hydrolyzates in immobilized enzyme reactor. *Acta. Biotechnol.* 7(3), 227~235.
- Malcata, F. X., C. G. Hill and C. H. Amundson. 1992. Hydrolysis of butteroil by immobilized lipase using a hollow-fiber reactor: Part II. Uniresponse kinetic studies. *Biotechnol. Bioeng.* 39, 984~1001.
- Mannheim, A. and B. H. Chiang. 1984. In: Engineering and Food Vol. 1, B. Mackenna(Ed.), *Applied Science Publishers*, London, U. K.
- Mennheim, A. 1988. Continuous hydrolysis of milk protein in a membrane reactor. *Master's Thesis, Univ. of Illinois, Urbana-Champaign.*
- Monsheimer, R., E. Pflleiderer. 1981. Method of dissolving collagen-containing tissues. *U. S. Patent* 4,293,647.
- Ney, K. H. 1979. Taste of potato protein and amino acid its derivatives. *J. Am. Oil Chemists' Soc.* 56, 295~297.
- Payne, R. E. and C. G. Hill. 1978. Enzymatic solubilization of leaf protein concentrate in membrane reactors. *J. Food Sci.* 43, 385~389.
- Sakai, G. S., N. Yamamoto, S. Yoshida, K. Mikuni, H. Ishigami and K. Hara. 1991. Continuous production of glucosyl-cyclodextrins using immobilized cyclomaltodextrin glucantransferase. *Agr. Biol. Chem. Tokyo*, 55(1), 45~52.
- Satterlee, L. D., N. Y. Zachariah and E. Levin. 1973. Utilization of beef and pork skin hydrolyzates as a binder or extender in sausage emulsion. *J. Food Sci.* 38, 268~270.
- Schwille, D., H. Seiz, E. Sorg and U. Sommer. 1977. Process for the production of protein-containing food additives. *Br. Patent*, 1,483,953 (to Agfa-Gevaert AG, BRD).
- Sevendsen, I. 1976. Chemical modifications of subtilisins with special preference to the binding of large substrate. *A review. Carlsberg Res. Commun.* 41, 237~291.
- Stanley, D. W. 1981. Non-bitter protein hydrolyzates. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 14, 49~52.
- 강태중·전유진·김세권·송대진. 1992. 가자미피 젤라틴 제조를 위한 전처리 방법의 검토. *한국수산학회지*, 25(2), 93~102.
- 김세권·변희국·M. Cheryan. 1991a. 한외여과막 반응기를 이용한 어피 젤라틴의 연속적 가수분해. *한국생물공학회지*, 6, 309~319.
- 김세권·양현필·이용호. 1991b. 어피의 효소적 가수분해물을 이용한 천연 조미료의 개발. *한국생물공학회지*, 6, 327~336.

1993년 2월 11일 접수

1993년 3월 6일 수리