

전세포 β -galactosidase의 캡슐 고정화

이 병 희 · 정 공 식 · 하 태 옥 · 박 중 곤
경북대학교 화학공학과

Immobilization Of Whole cell β -galactosidase in Calcium Alginate Capsule.

Byung Hee Lee , Geung Sik Jeong , Tae Wook Ha , Joong Kon Park
Department of Chemical Engineering, Kyungpook National University

서론

효소는 금속촉매보다 일반적으로 우수한 촉매 능력을 가진 고도로 특수화된 단백질로서, 기질에 대한 특이성이 우수하고 부산물이 거의 없는 것이 특징이다.

일반적으로 효소를 고정화[1]하여 사용하면 효소의 재 사용이 가능하고, 분리 정제면에서도 많은 장점이 있다. 그러나 효소 자체를 고정화할 경우 미생물에서의 효소 추출시 분리 및 정제, 오염등 여러 가지 문제점[2]이 발생해 미생물 자체를 고정화하는 전세포 효소 고정화법이 많이 연구되어 왔다.

본 연구에서는 bead보다 미생물을 고농도로 배양할 수있는 캡슐에 β -galactosidase를 생산하는 호기성균인 *E. coli*를 전세포 효소 고정화하였다. 캡슐내부에 균주와 함께 해바라기유를 고정화하여 배지내에서 배양할 때 캡슐내부로의 산소전달 효율을 높이고, C.C.T.B.(concentric circulating three phase bioreactor)를 이용해 배지용액과 공기가 잘 접촉할 수 있도록 하여 산소전달계수를 높이고자 하였다. 또한 이러한 산소전달의 증가가 전세포 효소의 activity 증가에 미치는 영향을 알아보려고 하였다.

실험

1. 캡슐 제조 및 고정화 효소의 활성화 측정

E.coli(KCTC 1116)을 담체내에 고정화 배양하는 것과는 달리 캡슐의 막벽과 떨어져 있는 calcium-alginate capsule에 고정화[3]배양하였다.

고정화된 전세포 효소의 활성화도는 O.N.P.G.(o-nitrophenyl- β -galactopyranoside)를 5 mM이 되도록 용해한 기질용액 10 ml를 60 °C로 예온한 후 캡슐 30 개를 넣고, 60 °C에서 1시간 동안 230 r.p.m.으로 반응시킨 후 급냉시키면서 1 M Na₂CO₃ 용액 10 ml를 가해서 반응을 정지시킨 다음 황색으로 발색된 기질용액의 흡광도를 측정하여 검량 곡선으로부터 O.N.P. 농도를 계산하였다. 본 실험에서의 활성화도는 캡슐 1개가 O.N.P.G.로부터 유리시키는 O.N.P. 1 μ M를 1 unit/capsule로 하였다.

2. 해바라기유 첨가시 산소전달계수 측정

캡슐내부에 균주와 해바라기유를 함께 고정화한 캡슐과 균주만 고정화한 캡

술을 성장배지[4]에 투입하여 각각 하루 동안 배양하였다. 이 캡슐들을 새로운 성장배지에 옮긴 후 flask내에서 시간에 따른 용존산소의 변화를 측정하여 배지로부터 캡슐내부로의 산소전달계수를 구하였다. 그리고 해바라기유를 첨가한 것과 첨가하지 않은 두 경우의 캡슐을 성장배지에서 42시간 키운 후 생산배지 [5]에 옮겨 배양한 후 효소의 활성을 측정하였다.

3. 산소공급 반응기에서 산소전달계수 측정

캡슐을 성장배지에서 42시간 동안 배양하고 생산배지가 들어 있는 반응기에서 24시간 동안 배양한 후 효소의 활성을 측정하였다. 동일한 조건으로 진탕배양기에서 실험하여 효소의 활성을 측정하였다.

산소전달계수, k_{La} 는 질소를 분사하여 산소를 완전히 제거한 배지에 공기를 주입하여 시간에 따라 변화되어지는 용존산소농도(C_L)를 측정하고, 포화농도 (C^*)와 C_L 의 차에 자연 log을 취해 그 기울기로서 산소전달계수를 구하였다.

결과 및 토론

균주를 캡슐내부에 고정화하고 성장배지에서 24시간 배양한 후 캡슐을 건져내어 새로운 성장배지에 투입한 다음, 새로운 배지내 용존산소농도 변화를 Fig. 1에 나타내었다. 캡슐 제조시에 해바라기유를 함께 고정화한 경우의 산소전달계수가 해바라기유를 첨가하지 않은 경우보다 78 % 증가하였다. 따라서 전세포 고정화 β -galactosidase의 활성도가 0.160 unit/cap으로 해바라기유를 첨가하지 않은 경우보다 10 % 증가하였다.

진탕배양기와 산소공급 반응기내에서 공기로부터 배지로의 산소전달계수 k_{La} 를 Fig. 2에 나타내었다. 산소공급 반응기 내부로 공급되는 공기의 유속이 20 ml/sec일 경우, 산소전달 계수가 진탕배양기의 경우보다 14배 증가하였고, 전세포 고정화 β -galactosidase의 활성도는 산소공급 반응기내로 공급되어지는 공기의 유속이 25 ml/sec인 경우는 진탕배양기의 경우보다 83 % 증가하였다. 이는 공기를 직접 배지내로 공급해 배지와 공기가 잘 접촉할 수 있어 산소전달 속도가 증가함으로써 전세포 고정화 β -galactosidase의 활성도가 증가된 것으로 사료된다.

결론

*E. coli*를 calcium-alginate capsule에 전세포 효소 고정화하였고, 해바라기유를 캡슐내부에 함께 고정화함으로써 캡슐 막을 통한 산소전달 계수는 78 % 증가되었고 이로인한 β -galactosidase의 활성도는 10 % 증가되었다. 그리고, 산소 공급 반응기를 이용해 배지내로의 산소전달계수를 높여 진탕배양기에서보다 β -galactosidase의 활성도를 83 % 증가시킬 수있었다.

참고문헌

1. Sarto, V., Marzetti, A. and Focher, B. : Enzyme Microb. Technol., 7, 517(1985).

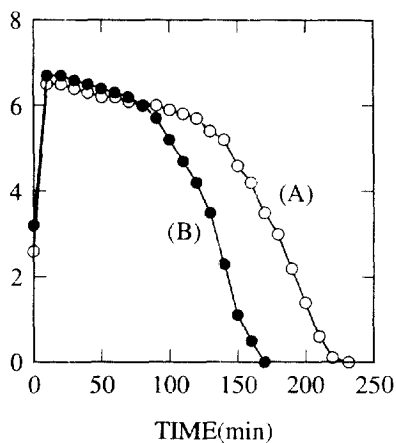


Fig. 1. The consumption of dissolved oxygen by the encapsulated *E. coli* pre-cultivated in the shaking flask for 24 hrs.

(A) : without additives (B) : with sunflower seed oil

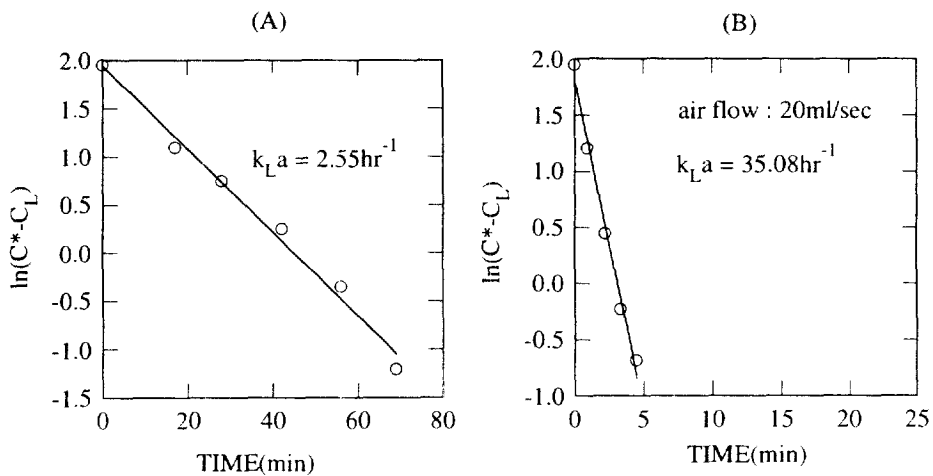


Fig. 2. Oxygen transfer from air bulk to medium

(A) : shaking flask
 (B) : concentric circulating three phase bioreactor

2. Daniel I. C. wang, Charles L. Cooney, Arnold L. Demain , Peter Dunnill, Arthur E. Humphrey, Malcolm D. Lilly : 238, A Willy-Interseience(1979).
3. Cheong, S. H., Park, J. K., Kim, B. S. and Chang, H. N. : Biotechnol. Techniques, 7, 12, 879(1993).
4. Park, Y. H. and Bae, K. S. : 161, Korean Collection For Type Cultures(1992).
5. Toda, K. and Shoda, M. : Biotechnol. Bioeng., 1728(1975).