

전세포 *Escherichia coli* β -galactosidase의 캡슐고정화

이 병 희 · †박중곤

경북대학교 공과대학 화학공학과

Encapsulation of Whole Cell β -Galactosidase of *Escherichia coli*

Byung Hee Lee and Joong Kon Park[†]

Dept. of Chemical Engineering, Kyungpook National University, Taegu 702-010, Korea

ABSTRACT

Escherichia coli was inoculated in calcium alginate capsules and cultivated to prepare encapsulated whole cell β -galactosidase. The dry cell weight in the capsule reached 100 g/L based on the inner space of the capsule. The activity of the encapsulated whole cell β -galactosidase increased with the dry cell weight increase during cultivation in the production medium. The activity of the encapsulated whole cell β -galactosidase was increased 25% by adding 2×10^{-4} M Zn^{+2} ion in the production medium and 10% by coencapsulating with 2%(v/v) sunflower seed oil. The activity of encapsulated whole cell β -galactosidase produced in the concentric air lift reactor in which $k_{1,a}$ was 82/hr was 86% higher than that in the shaking flask incubator where $k_{1,a}$ was 2.55/hr.

서 론

효소는 우수한 촉매능력을 가진 고도로 특수화된 단백질로서 기질에 대한 특이성이 우수하고 부산물이 거의 없으며 생체내에서 최적활동을 할 수 있도록 설계되어 있다. 효소를 공업적으로 사용하는 경우 미생물에서 효소를 추출하여 고정화하여 사용하고 있다. 효소는 여러가지 방법으로 고정화되어 사용되어 왔지만 직접적인 효소의 고정화 과정에서 발생하는 오염문제와 효소추출과정의 복잡성, 전체생산가격의 70%를 차지하는 정제비 등의 문제가 발생한다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 효소를 생산하는 미생물 자체를 고정화하는 전세포효소 고정화법이 많이 연구되었다. 전세포효소 고정화법은 단위 부피당 효소의 역가는 낮더라도 효소활성의 회수수

율이 매우 높고 분리 고정화작업이 간편한 장점이 있다(1).

미생물의 고정화법으로는 celite 등의 표면에 부착배양하는 방법, bead내에 entrap하는 방법, capsule 내부의 자유용액에 encapsulation하는 방법, hollow fiber 내부에 고정화하는 방법 등이 있다. 이 중에서 bead 내부에 entrap하는 방법이 가장 보편적으로 사용되고 있으나, bead를 구성하는 고분자물질의 기계적 강도때문에 미생물을 부피비로 25% 이상 고정화시킬 수 없는 단점이 있다(2). 또한 bead내에 미생물을 고정화배양하는 경우 미생물이 bead 밖으로 새어 나오며 bead 내부에서의 물질 및 산소 전달의 문제가 있다. 이에 반하여 캡슐의 경우는 캡슐의 얇은 막의 내부공간이 매우 넓으며 물질전달의 저항이 상대적으로 작다. Lim은 1984년 2단계법으로 캡슐내부에 동물세포를 고정화하여 단일군 항체

[†] Corresponding Author

를 생산하였다(3). 최근에 Wang 등은 1단계법의 캡슐고정화법을 개발하였고(4) 다양한 고분자물질을 이용하여 동물세포를 고정화하여 단일균향체를 생산하였다(5). Bead에 동물세포를 고정화한 경우 생산된 단일균향체가 배지용액상에 존재하지만, 캡슐의 경우는 생산된 단일균향체가 캡슐내부에 고농도로 축적이 된다. 동물세포에 비하여 약 50~100 배 정도의 산소를 필요로 하는 미생물의 고정화는 최근에 Cheong 등에 의하여 시도되었다(6-8). 캡슐내부에 *Saccharomyces cerevisiae*를 고정화 배양하여 캡슐내부 건조중량이 300g/L에 달하였으며 캡슐내부와 배양액사이의 균주격리가 완벽하였다(6). 배양액과의 균주격리가 완벽함에도 캡슐내부 세포의 고농도화로 에탄올의 생산성은 고정화 bead의 경우와 거의 같았다(7). L-lysine을 생산하는 *Corynebacterium glutamicum*을 고정화하여 배양하는 경우 캡슐내부와 배양액사이의 균주격리가 완벽하지는 못하였지만 배지조성에 따라서 캡슐내부의 미생물 건조중량은 200g/L에 달하였다(8).

이와 같은 캡슐내부의 미생물 고정화법을 이용하여 전세포 효소 고정화 캡슐을 제조할 수 있을 것이다. 즉, 효소를 생산할 수 있는 미생물을 캡슐제조시 접종하고 성장배지 및 생산배지에서 미생물을 배양하여 캡슐내부에 고농도로 축적시킨다. 이와 같은 방법으로 분리, 정제의 과정을 줄여서 쉽게 고농도의 전세포 고정화 효소를 준비할 수 있을 것이다. 미생물로서는 recombinant cell을 사용하면 많은 종류의 효소를 캡슐 고정화 전세포 효소화할 수 있다. 따라서 본 연구에서는 recombinant cell로서 가장 널리 사용되고 있는 *Escherichia coli*를 선택하고 lactose를 기질로 사용하여 캡슐내에 전세포 β -galacto-

sidase를 고정화하고자 하며 그에 따른 제반 특성을 조사하고자 한다.

재료 및 방법

균주 및 배지

본 연구에서 사용된 균주는 β -galactosidase를 생산하는 *E. coli*(KCTC 1116)과 *E. coli*(ATCC 53323)며 각각 유전공학연구소 및 KAIST 생물공학실로부터 분양받아 사용하였다. 캡슐내부에서 glucose의 농도에 따른 *E. coli*의 성장양태 등을 관찰하기 위한 성장배지와 성장한 *E. coli*의 내부에 β -galactosidase를 축적하기 위한 생산배지의 조성은 Table 1과 같다.

캡슐제조 및 전세포 효소 고정화 방법

Calcium alginate 캡슐의 제조는 Cheong(6)의 방법을 사용하였다. 성장배지를 autoclave에서 멸균한 후 laminar flow chamber에서 30mL의 성장배지에 균주를 접종하였다. Shaking incubator에서 37°C, 140rpm의 조건으로 24시간 성장시킨 후 배양액 10mL을 채취하여 3600rpm의 원심분리기에서 10분간 균주를 원심분리하였다. 분리균주를 100mL의 CaCl₂ 용액에 2시간 혼합한 후, 혼합용액을 회전하고 있는 sodium alginate 용액에 방울방울 떨어뜨려서 외경과 막두께가 각각 2mm 및 0.2mm인 구형의 캡슐을 제조하였다. 제조된 캡슐을 건져 내어 증류수에서 10분간 세척하고 pH 7.2의 HEPES 완충용액에서 10분 동안 수축시켰다.

캡슐내부에 접종된 *E. coli*를 고농도로 성장시키기 위하여 lactose 보다도 비성장속도가 빠른 glucose

Table 1. Composition of growth and production media for *E. coli* (g/L)

Composition	<i>E. coli</i> (KCTC 1116)					<i>E. coli</i> (ATCC 53323)		
	Growth medium					Production medium	Growth medium	Production medium
	GM1	GM2	GM3	GM4	GM5			
Yeast Extract	10	10	10	10	10	2	5	2
NaCl	10	10	10	10	10		10	
Peptone						5		5
Glucose		10	20	30	40			
CaCl ₂	10	10	10	10	10	10	10	10
CaCO ₃	50	50	50	50	50	50	50	50
Lactose						10		10
Tryptone	10	10	10	10	10		10	
Beef Extract						5		5

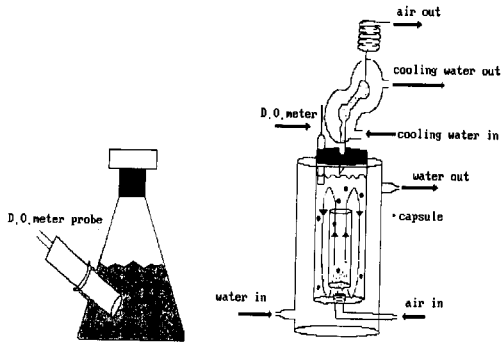


Fig. 1. Schematic presentation of flask incubator and concentric air lift reactor.

로 구성된 성장배지에서 42시간 배양하였다. 성장배지에서 *E. coli*가 내부에 배양된 캡슐을 lactose로 구성된 생산배지로 옮겨 24시간 재배양함으로써 β -galactosidase를 측정시켰다.

발효장치

미생물 고정화 캡슐을 제조하여 Fig. 1에 나타난 플라스크 진탕배양기와 concentric air lift reactor에서 각각 배양 및 효소측정실험을 행하였다. Air lift reactor는 유리로 제작되었고 외부관의 길이와 지름은 각각 15, 4cm이며 내부관은 5, 2cm이다. 반응기로 공급되는 공기는 glass wool과 filter를 이용하여 정화되었고 유량속도는 밸브와 유량계로 조절하였다.

배양중 용액내의 용존산소의 농도를 측정하기 위하여 DO meter(TPS Electronics, Austria)를 이용하였다. 배지용액으로의 산소전달계수인 부피산소 전달계수, $k_{l,a}$ 는 비정상상태방법인 gassing in method를 사용하여 측정하였다. 배지용액이 담겨 있는 배양기에 질소를 분사하여 산소를 제거한 다음 공기를 주입하면서 시간에따른 용존산소의 농도를 측정하였다. 포화농도와 용존산소농도의 차에 대한 자연log를 시간에 대하여 plot하고 그 기울기로서 $k_{l,a}$ 를 구하였다.

건조중량 및 효소 활성도 측정

배양중 고정화 캡슐로부터 배양액으로 스며 나오는 미생물의 개체수를 측정하였다. 성장배지 50mL에 미생물이 접종된 캡슐 30개를 진탕배양기에 넣은 후, 매시간마다 배지 2mL을 추출하여 $10^3 \sim 10^9$ 배 희석한 다음, 일정한 격자구조를 가지고 있는 hemocytometer(BRANDL, German)위에 놓은 후 광학

현미경(CARL ZEISS JENA, German)을 이용하여 배양도중 캡슐로부터 새어 나오는 미생물의 개체수를 측정하였다. Hemocytometer의 각 칸을 20칸 이상 세어 평균을 취하였다. 또한 미생물이 고정화 접종된 캡슐을 24시간 성장배지에서 배양하고 캡슐을 새로운 배지에 옮겨 캡슐로부터 배양기로 새어 나오는 미생물의 개체수를 위와 동일한 방법으로 측정하였다.

미생물을 접종한 직후의 캡슐과 접종한 캡슐을 배지에서 배양한 후의 캡슐을 각각 95°C의 항온건조기에서 24시간 건조한 후, 두 경우의 건조무게 차이를 캡슐내부의 미생물 건조중량으로 취하였다. 항온 건조기에서 건조할 때 20시간이 경과하면 건조무게는 더 이상 감소하지 않고 일정한 값을 나타내었다. 또한 캡슐에 고정화된 미생물의 건조중량 단위(g/L)는 캡슐 한 개 내부의 미생물 건조중량에 대한 캡슐내부부피의 비로 나타내었다.

β -galactosidase의 활성도는 Lederberg의 방법(9)을 사용하여 측정하였다. 5mM의 ONPG(o-nitrophenyl- β -galactopyranoside) 기질용액 10mL을 60°C로 예온한다. 준비된 전세포효소 고정화 캡슐 30개를 넣고 60°C에서 한시간동안 230rpm으로 반응시킨 후 급냉시키면서 1M Na_2CO_3 용액 10mL을 가해서 반응을 정지시킨 다음 황색으로 발색된 흡광도를 UV-VIS spectrophotometer(Shimadzu 1201)를 사용하여 파장 420nm에서 측정하였다. 흡광도와 ONP(o-nitrophenol) 농도의 검량곡선을 이용하여 활성도를 계산하였다. 고정화 캡슐이 ONPG로부터 ONP 1 μ M을 유리시키는 활성도를 1 unit으로 하였다.

Glucose 농도 측정

Glucose 농도는 PGO enzyme(Sigma, No. 510-A)을 사용하여 측정하였다. Sample 용액을 700배 희석하여 희석된 용액 0.5mL와 combined enzyme-color reagent solution 5mL을 함께 시험관에 넣고 37°C에서 30분간 반응시킨 후 UV-VIS spectrophotometer(Shimadzu 1201)를 사용하여 450nm에서 OD를 측정하고 OD-glucose 검량곡선을 이용하여 glucose 농도를 계산하였다.

결과 및 고찰

미생물의 선정 및 성장양태

Cell이 생산하는 효소가 endoenzyme 또는 exo-

Table 2. β -Galactosidase activity in the broth solution

Broth solution	Activity (unit)	
	<i>E. coli</i> (ATCC 53323)	<i>E. coli</i> (KCTC 1116)
Supernatant	0.032	0
Precipitate	0	0.012

Table 3. Effect of growth medium compositions on the dry cell weight of encapsulated *E. coli*(KCTC 1116).

Day	Dry cell weight of encapsulated cells (g/L of capsule)				
	GM1	GM2	GM3	GM4	GM5
1	29.55		39.18		
2	131.27	60.83	48.80	85.91	39.17
3	121.43	47.08	47.42	32.3	33.68

enzyme의 형태로 존재할 수가 있다. *E. coli*(ATCC 53323)와 *E. coli*(KCTC 1116)을 성장배지와 생산 배지에서 배양하고 자유세포를 원심분리하여 각각을 상등액과 침전액으로 나눈 다음 β -galactosidase 활성도를 측정하였다. 그 결과는 Table 2와 같이 *E. coli*(ATCC 53323)은 exoenzyme을 *E. coli*(KCTC 1116)은 endoenzyme을 생산하였다. 본 연구는 *E. coli*를 이용한 전세포 고정화 캡슐의 기초연구에 해당하므로 사용미생물의 범위를 endoenzyme을 생산하는 *E. coli*(KCTC 1116)에 한정하였다.

Table 1에 보여진 성장배지 50mL에 *E. coli* (KCTC 1116) 균주가 접종된 30개의 캡슐을 넣어 배양했을 때, 시간에 따른 캡슐내부의 미생물 건조중량이 Table 3과 같다. 미생물의 내부 건조중량은 반복 실험치의 평균값이다. 미생물은 LB 배지인 GM1 배지에서 가장 많이 성장하는 것을 알 수 있다. 그러나 배지성분 중에 glucose가 포함된 GM2, GM3, GM4, GM5 배지에서 배양을 하면, 캡슐내부에 미생물이 자라지만 glucose가 없는 GM1 배지에서는 미생물이 Fig. 2의 사진에서와 같이 캡슐 외부 벽에 부착되어 자라고 있다. Glucose가 없는 GM1 배지에서는 3일째 미생물의 건조중량이 반복실험에서 각각 219.24, 23.61g/L을 나타내고 있다. 이는 미생물이 캡슐의 외부벽면에 부착되어 자라다 미생물이 어느 두께 이상 자라게 되면 벽면에서 떨어져 나가 23.61g/L이 되고 미생물이 떨어져 나가기 직전 219.24g/L이 되는 것으로 사료된다. GM3 배지에서 캡슐에 접종된 *E. coli*를 배양하는 동안의 배

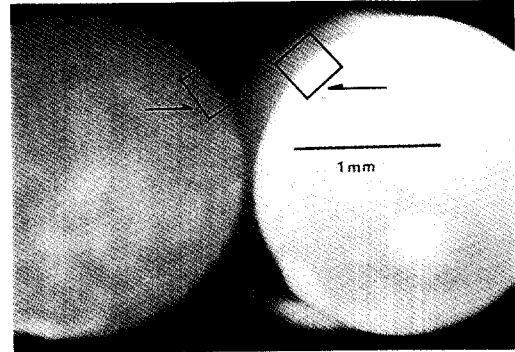


Fig. 2. State of encapsulated *E. coli* after being cultured in the growth medium GM1(left) and GM3(right) for 48hours.

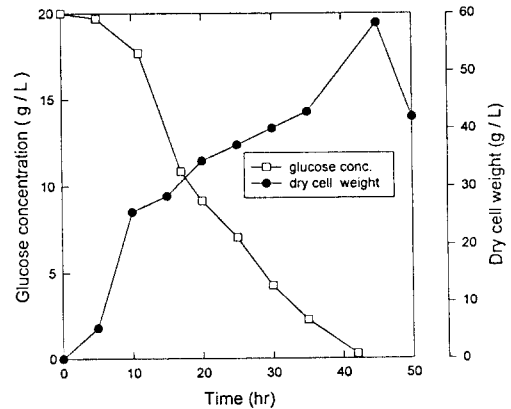


Fig. 3. Glucose consumption and dry cell weight of encapsulated *E. coli* cultured in the growth medium GM3.

지중의 glucose 농도 감소에 따라 캡슐내부의 미생물 건조중량은 Fig. 3에서와 같이 꾸준히 증가함을 나타내고 있다.

고정화 미생물의 배양액과의 격리

효모의 경우는 캡슐내에 접종된 미생물을 배지용액중에서 배양하는 경우 캡슐막에 의하여 완전히 격리된다(6, 7). 그러나 크기가 0.5~2 μ m 정도인 *Corynebacterium glutamicum*은 배양중 캡슐막을 통하여 배지용액으로 스며 나와 자라게 되었다(8). SEM 사진 촬영결과 캡슐막 표면의 pore 직경이 약 3~4 μ m 정도가 되었다. 비록 막의 두께가 100 μ m 정도가 되고 막내의 pore에 tortuosity가 있더라도

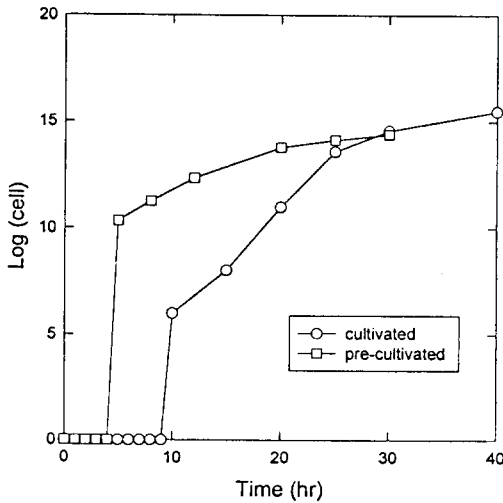


Fig. 4. Number of cells leaked from mature capsule pre-cultivated in the growth medium GM3 for 24hours and immature capsule cultivated in the growth medium GM3.

Table 4. Activities of encapsulated whole cell β -galactosidase according to the compositions of growth medium.

Growth medium	GM2	GM3	GM4	GM5
Dry cell weight(g/L) after 48hours cultivation in growth med.	60.83	48.80	85.91	39.17
Dry cell weight(g/L) after 48hours cultivation in production med.	86.11	86.11	112.22	73.89
Activity(unit/capsule)	0.097	0.184	0.108	0.119

박테리아는 스며 나옴을 알 수 있었다. 따라서 캡슐 내부에 *E. coli*를 접종하여 배양하는 경우 캡슐내부의 미생물이 배지속으로 스며 나올 가능성이 있으므로 시간에 따른 배지용액상의 *E. coli*수를 조사하였다. Fig. 4에서 보이는 것처럼 캡슐내부에 *E. coli*를 접종한 직후 배지에서 배양하는 경우 약 10시간이 경과한 후부터 *E. coli*가 배지용액으로 스며 나와 성장하는 것을 알 수 있다. 이는 Fig. 3에서 캡슐 내부의 *E. coli* 건조중량이 약 20g/L이 넘는 경우에 새어 나오는 것을 알 수 있다. 접종된 캡슐을 성장배지에서 24시간 배양하여 캡슐내부의 미생물 건조중량이 37g/L인 캡슐을 새로운 성장배지에 넣어 배양하는 경우 5시간째부터 배지에서 *E. coli*를 확인할 수 있었다.

캡슐고정화된 *E. coli* 전세포 β -galactosidase 성장배지의 조성에 따른 영향

*E. coli*가 접종된 캡슐을 성장배지 GM3에서 2일간 배양한 캡슐 30개씩을 pH가 6, 7, 8, 9인 생산배지 50mL에서 배양하였다. 생산배지에서 배양2일째에 가장 높은 β -galactosidase의 활성을 보였으며, 각 pH에 따라 0.17, 0.184, 0.178, 0.154 unit/capsule로 나타났다.

Table 1에 나타난 GM2, GM3, GM4, GM5의 성장배지용액에서 48시간 배양한 후, 캡슐을 건져 pH 7의 생산배지에서 48시간 배양하였을 경우 캡슐 내부에 축적된 β -galactosidase의 활성을 Table 4에 나타내었다. 고정화된 *E. coli*의 건조중량은 GM4 성장배지에서 2일간 성장시킨 후 생산배지에서 배양한 경우가 가장 큰 값으로 나타났지만, 균주의 활성도는 GM3에서 배양한 경우가 가장 높게 나타났다. 성장배지 GM4와 생산배지에서 배양하면 *E. coli*의 캡슐 내부건조중량이 112.22g/L로 매우 크지만 이 중에서 생산배지에서 배양하는 동안은 26.3g/L 밖에 증가하지 않았다. 성장배지 GM3와 생산배지에서 배양한 경우 건조중량은 86.11g/L에 불과하지만 생산배지에서 배양되는 동안 증가된 건조중량은 34.7g/L이다. Table 4의 결과를 보면 캡슐내부에 축적되는 전체미생물의 양도 중요하지만 생산배지에서 배양되는 동안 증가되는 미생물의 양이 β -galactosidase의 활성 축적에 더 큰 영향을 미침을 알 수 있다.

금속이온의 첨가

미생물로부터 정제된 β -galactosidase는 단원자나 다원자 양이온의 존재하에서 이 이온들이 효소활성을 위한 비단백질기로 작용하기 때문에 활성도가 높게 나타나는 현상을 보인다(10). 그러므로 본 연구에서는 *E. coli*가 접종된 캡슐 30개를 GM3 성장배지 50mL에서 2일간 배양한 후, Zn^{+2} , Mg^{+2} , Co^{+2} 의 금속이온 농도가 $2 \times 10^{-4}M$ 인 pH 7의 생산배지에서 2일간 배양하였다. 캡슐내부에 축적된 *E. coli*의 건조중량 및 β -galactosidase의 축적된 활성은 Table 5와 같다. 앞절의 성장배지 조성에 의한 영향과 같이 생산배지에서 배양하는 동안 캡슐내부에 축적되는 *E. coli* 건조중량이 클수록 β -galactosidase의 활성이 더 많이 축적되었다. 생산배지에 Zn^{+2} 를 첨가함으로써 캡슐내부에 축적되는 건조중량은 1.49배, 효소의 활성도는 1.25배 증가되었다. 그러나 Co^{+2} 를 첨가하는 경우는 건조중량 및 효소의 활성도가 오히려 감소하였다.

Table 5. Effect of metal ions of the production medium on the activity of the encapsulated whole cell β -galactosidase.

Additives in the prod. medium	Dry cell weight(g/L) of encapsulated <i>E. coli</i> in the growth medium	Dry cell weight(g/L) increasement in the production medium	Activity of the whole cell enzyme (unit/capsule)
—	50.17	34.27	0.186
Mg ⁺²	50.17	35.16	0.198
Zn ⁺²	50.17	50.94	0.232
Co ⁺²	50.17	17.60	0.130

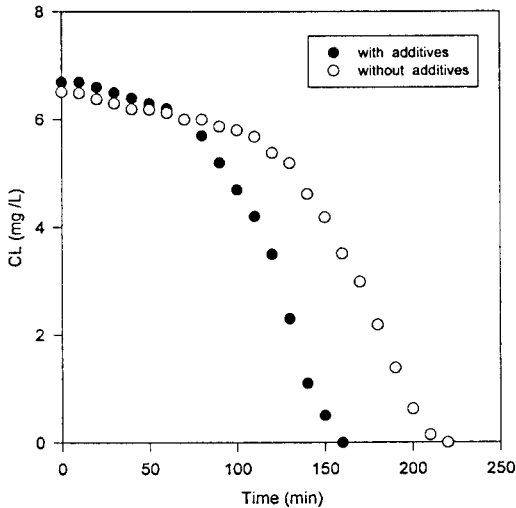


Fig. 5. Consumption of dissolved oxygen by the encapsulated *E. coli* precultivated in the shaking flask for 24hours.

해바라기유의 첨가

캡슐내부에 고정화된 *E. coli*는 호기성 균주이다. 배양액으로부터 캡슐내부로의 산소전달 속도를 증가시키기 위하여 산소와 결합력이 강한 해바라기유(11)를 캡슐내부에 *E. coli*를 접종할 때 같이 고정화하였다. 캡슐제조시 해바라기유를 부피비 2%가 되도록 CaCl₂ 용액에 첨가하면 해바라기유가 CaCl₂ 용액에 섞이지 않고 불균일한 상을 이룬다. 이 불균일한 상은 캡슐제조시(6) nonionic surfactant (Nonoxynol C₁₂H₂₅C₆H₄(OC₂H₄)_nOH)를 0.7g/L 이상 첨가함으로써 균일한 상을 만들 수가 있었다. 해바라기유를 첨가한 캡슐과 첨가하지 않은 캡슐 100개씩을 GM3 성장배지 100mL에 투입하고 하루동안 배양하고 측정한 *E. coli*의 캡슐내부 건조중량은 각각 32.57, 36.28g/L이었다. 이 조건으로 배양된 캡슐들을 두 겹의 parafilm과 foil로 막은 새로운

GM3 성장배지에 옮겨 시간에 따른 배지내의 용존 산소의 농도 변화를 측정하여 Fig. 5에 나타내었다. 배지용액은 parafilm과 foil로 밀봉이 되어 있고 Fig. 4에서의 결과와 같이 캡슐내부의 *E. coli*는 5시간 이내에는 배지용액으로 스며나오지 않기 때문에, 배지용액상의 용존산소의 감소는 캡슐 내부의 *E. coli*에 의하여 소모된 것으로 간주될 수 있다. 해바라기유를 첨가한 경우 캡슐내부의 미생물양이 첨가하지 않은 경우보다 미량 적음에도 불구하고 산소가 약 1시간 일찍 완전 소모되었다. 즉, 해바라기유의 첨가로 캡슐막을 통한 산소의 투과속도가 증가됨을 알 수 있었다. 성장배지에서 2일간 배양된 캡슐을 생산배지에 재투입하고 2일간 배양한 결과 캡슐내부에 축적된 β -galactosidase의 활성은 각각 0.146, 0.160unit/capsule이었다. 해바라기유를 부피비로 2% 캡슐내부에 투입하여 캡슐막을 통한 산소 전달 속도를 증가시킬 수 있었고 이로 인하여 캡슐내부에 축적된 β -galactosidase의 활성은 약 10% 증가되었다.

Concentric Air Lift Reactor

산소공급이 충분히 이루어 질 수 있는 Fig. 1의 concentric air lift reactor 내에서 고정화 캡슐을 배양하였다. 재료 및 방법의 절에서 기술한 gassing in method로 측정할 바, concentric air lift reactor에 공기를 5mL/sec로 공급할 경우 부피산소전달 계수, $k_L a$ 의 값은 82h⁻¹로 flask 배양기내에서의 $k_L a$ 값 2.55h⁻¹ 보다 32배의 큰 값을 보였다. 플라스크 배양기와 concentric air lift reactor에 각각 100 mL의 성장배지와 *E. coli*가 접종된 캡슐을 100개씩 넣고 배양하였다. 플라스크 배양기의 경우에는 시간이 경과함에 따라 배양액내의 용존산소 농도가 0으로 떨어졌으나, concentric air lift reactor 내에서는 약 5시간이 경과한 후 약 1ppm으로서 정상상태의 농도를 유지하였다. 즉 이것은 배양액의 용존산

소가 1ppm로 유지되는 상태에서 공기중에서 배양액으로 이동되는 산소의 양과 배양액에서 캡슐내부로 이동되어 미생물이 소모하는 산소의 양의 크기가 같음을 나타낸다. 공기로부터 배양액으로의 부피산소 전달계수 $k_L a$ 가 증가하여 산소전달이 조금 더 커질 수 있다면 배양액중의 산소농도가 포화농도 8ppm보다는 낮지만 조금 증가하여 새로운 평형상태에 도달한다. 그러나 $k_L a$ 값이 매우 작아 배양액으로의 산소공급이 작아지고 미생물의 산소소모양에 미치지 못한다면 배양액 내부의 용존산소는 0이 될 것이다. 따라서 concentric air lift reactor내에서는 *E. coli*의 산소요구량을 충분히 공급할 수 있었다. 플라스크배양기내의 GM3 성장배지에서 2일간 배양한 캡슐 100개씩을 생산배지 100mL씩 채워져 있는 플라스크 배양기와 공기가 5mL/sec로 공급되는 concentric air lift reactor에 투입하고 2일간 배양하였다. 산소가 충분히 공급된 결과, 생산배지내에서 배양되는 동안 캡슐내부에 축적된 *E. coli*의 건조중량은 57.7g/L로서 flask 배양 경우의 23.3g/L보다 148%의 증가가 있었다. 캡슐내부에 축적된 β -galactosidase의 활성은 0.271unit/capsule로서 flask 배양의 0.146unit/capsule 보다 86%의 증가를 보였다.

요 약

전세포 효소 고정화 캡슐을 제조하기 위하여 *Escherichia coli*를 calcium alginate 캡슐내부에 접종하고 배양하였다. *E. coli*의 캡슐내부 건조중량이 100g/L에 달하였다. 생산배지에서 배양하는 동안 캡슐내부에 축적되는 미생물의 양이 많을수록 캡슐내부에 축적되는 β -galactosidase의 활성도 높았다. 생산배지에 금속이온 Zn^{+2} 를 2×10^{-4} M 첨가함으로써 캡슐내부에 축적되는 β -galactosidase의 활성을 25% 증가시킬 수 있었다. 캡슐제조시 해바라기유를 부피비로 2% 첨가함으로써 캡슐내부에 축적되는 β -galactosidase의 활성을 10% 증가시킬 수 있었다. 부피산소전달계수, $k_L a$ 가 2.55h⁻¹인 플라스크 대신 $k_L a$ 82h⁻¹인 concentric air lift reactor 내에 서 고정화 *E. coli*를 배양함으로써 캡슐내부의 전세

포 β -galactosidase의 활성을 86% 증가시킬 수 있었다.

감 사

본 연구는 생물공정연구센터의 지원에 의하여 이루어졌으며 이에 감사를 드립니다.

참고문헌

1. P. Brodelius and E. J. Vandamme(1987), *Immobilized Cell Systems*, in Biotechnology(J. F. Kennedy, ed.) Vol. 7a, p. 405, VCH, NY.
2. K. Buchholz(1979), *Characterization of Immobilized Biocatalysts in Dechema Monographs*, vol. 84, Verlagchemie, Weinheim.
3. F. Lim(1984), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **10**, 81.
4. S. C. Nigam, I. F. Tsao, A. Sakoda, and H. Y. Wang(1988), *Biotechnol. Techniques*, **2**, 271.
5. T. Yoshioka, R. Hirano, T. Shioya, and M. Kato(1990), *Biotechnol. Bioeng.*, **35**, 66.
6. S. H. Cheong, J. K. Park, B. S. Kim, and H. N. Chang(1993), *Biotechnol. Techniques*, **7**, 879.
7. S. H. Cheong, J. K. Park, and H. N. Chang(1993), *J. KICChE*, **33**, 105.
8. S. H. Cheong, T. J. Lee, J. K. Park, and H. N. Chang(1995), *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, **10**, 78.
9. J. T. Ulrich, G. A. McFeters, and K. L. Temple(1972), *J. Bacteriology*, **110**, 691.
10. K. Wallenfells and R. Weil(1972), *The Enzymes*,(P. D. Boyer, ed.) Vol. 7, p. 618, Academic Press, NY.
11. 장호남(1993), 생물화학공학, p. 177, 대영사, 서울.