

*Pseudomonas putida*에서 생산된 전세포 benzoylformate decarboxylase의 활성특성 및 고정화 캡슐 제조

정재용 · ¹하태욱 · 홍진혁 · 오창엽 · 박중곤
경북대학교 공과대학 화학공학과, ¹대구과학대학 환경공학과
(접수 : 1998. 11. 11., 게재승인 : 1999. 5. 12.)

Characteristic of whole cell benzoylformate decarboxylase from *Pseudomonas putida*

Jae-Yong Jung, Tae-Wook Ha¹, Jin-Huck Hong, Chang-Yub Oh, and Joong-Kon Park[†]
Dept. of Chemical Engineering, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea
¹Dept. of Environmental Engineering, Taegu Science College, Taegu 702-723, Korea
(Received : 1998 11 11., Accepted : 1999. 5. 12.)

Benzoylformate was converted to benzaldehyde by whole cell enzyme from *Pseudomonas putida* KCTC 1751. We investigated the effect of the composition of the growth medium on the accumulation of benzoylformate decarboxylase in the microbial cell. We prepared a calcium alginate capsule containing *Pseudomonas putida* cells to develop a reusable whole cell enzyme. *Pseudomonas putida* cells were inoculated in the capsule and cultured in M1 medium for 1 day followed by cultivation in M3 medium for 3 days. The dry cell density reached 77.75 g/L on the basis of the inner volume of the capsule. The specific activity of encapsulated whole cell benzoylformate decarboxylase was half as high as that of free whole cell enzyme. The activity of encapsulated whole cell benzoylformate decarboxylase decreased 20 % after use for 20 batches and 40% after use for 30 batches. The dry cell density reduced about 10 % after 30 trials.

Key Words : *Pseudomonas putida*, benzoylformate decarboxylase, encapsulation, biotransformation

서론

효소는 촉매작용을 하는 고분자 단백질이다. 효소를 일반적인 촉매와 비교해볼 때 기능이 다양하며 반응의 범위가 넓으며 상온, 상압에서 사용되면서도 반응속도가 높고 부산물이 매우 작아 선택성이 우수하다는 장점이 있다(1).

이러한 특성을 지닌 효소를 균체에서 추출하여 사용하는 대신 균체 그대로를 고정화하는 방법도 개발되고 있다. 미생물을 고정화 배양하면 균체에서 효소를 분리 고정화하는 과정을 줄일 수 있고 추출 조작 중에 발생하는 효소활성의 저하를 막을 수 있다. 또한 열, 강산 또는 강알칼리, 유기용매와 같은 독성 물질 등으로부터 미생물을 보호할 수 있고 고정화 미생물을 조작하거나 회수하기가 용이해 재사용이 가능하며 때로는 유전자 안정성을 향상시킬 수도 있다.

현재까지 알려진 미생물 고정화 방법에는 폴리우레탄이나 셀라이트 등의 담체에 미생물을 부착시키는 방법 또는 alginate, chitosan, collagen 등의 고분자 물질의 bead내에 미생물을 고

정화 배양하는 방법과 막을 이용하는 것으로서 이중 실관 반응기 막속에 가두어서 배양하는 방법(2) 등이 있다. 이중에서 bead 고정화법이 가장 보편적으로 사용되고 있으나 미생물의 배양영역이 매우 작으며 담체의 중심 부근에서는 영양분 및 산소의 부족으로 미생물의 생존이 불가능한 영역이 생길 수 있다. 또한 미생물이 담체부피의 25% 이상이 되면 고분자 bead의 기계적 강도가 약하여 파손되는 문제가 있다(3). 이러한 단점으로 인하여 넓은 배양영역을 확보할 수 있으며 미생물과 용액의 분리가 용이한 캡슐 고정화법이 개발되었다(4-9,19).

유기화합물의 합성에서 효소사용의 장점은 높은 반응속도와 입체특이성 그리고 상대적으로 mild한 반응조건 등을 들 수 있는데(1), 특히 반응이 enantioselective이면 C-C 결합 형성을 증대하는 효소는 bioorganic 합성의 견지에서 볼 때 매우 중요하다. 그러나 이러한 biotransformation 반응의 예들은 현재까지도 많이 알려지지 않았으며 비교적 좁은 기질특이성을 지닌다. 현재까지 캡슐 고정화법을 사용하여 benzoylformate로부터 유기용매인 benzaldehyde의 제조는 아직 보고된 바가 없다. 특히 odorant, flavor의 제조를 위한 starting-material 그리고 향수, 비누, 음식, 음료에 직접 혼합되며 여러 가지 의약품질의 중간체로 쓰이는 등 매우 많은 용도를 지니고 있는 benzaldehyde는 용해된 benzoylformate를 500 °C하에서 열분해를 통하여 얻을 수 있으나 생합성법을 이용하면 상온, 상압하에서 얻을 수 있다.

[†] Corresponding Author : Dept. of Chemical Engineering,
Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea
FAX: 053-950-6615, Phone: 053-950-5621
e-mail : parkjk@kyungpook.ac.kr,

본 실험에서는 호기성 균주이며 mandelate pathway(10,11)의 효소인 benzoylformate decarboxylase를 가진 *Pseudomonas putida*(KCTC 1751)를 calcium alginate 캡슐내에 고정화하여 미생물의 성장양태와 반응시간에 따른 전세포효소의 활성을 자유배양과 비교, 검토함으로써 캡슐고정화 whole cell benzoylformate decarboxylase를 이용하여 benzaldehyde를 생산하는 기초자료를 얻고자 하였다 먼저 자유배양과 캡슐 고정화 미생물 배양에서 배지 조성에 따른 미생물의 성장 양태와 효소의 활성을 기준으로 최적배지를 선정하고 효소 반응에 의해 생성되는 물질의 농도를 조사할 것이다. 또한 산소전달의 영향을 알아보기 위하여 배양시 배지의 양에 따라서 균주의 성장양태와 활성을 조사하고 고정화 캡슐의 재사용에 대해서도 조사하고자 한다.

재 료 및 방법

균주 및 배지조성

본 연구에서는 benzoylformate decarboxylase를 생산하는 *Pseudomonas putida*(KCTC 1751)를 KCTC로부터 분양 받아 사용하였으며, 30℃, 200rpm 조건하에서 24시간 배양하였고 배지 조성은 Table 1에 나타냈으며 배지의 pH는 7.0으로 보정하였다. 균주의 활성을 유지하기 위해 2주마다 계대배양을 하고 3℃의 냉장고에 보관하였다. 균주의 고형 배지는 Beef extract 3g/L, Peptone 5g/L, Agar 15g/L를 사용하였다. 각 배지중 M1 배지는 benzoylformate decarboxylase와 acyloin product를 생산하는 효소를 얻기 위해서 R. Wilcocks(12) 등이 사용한 배지와 조성이 동일한 배지이며 M2배지는 미생물의 건조중량을 증

가시키기 위해서 M1배지에 비성장 속도가 높은 LB배지를 첨가한 배지이다. 또한 캡슐 고정화 미생물 배양시 phosphate에 의한 캡슐의 용해 방지를 위하여 M2배지 조성 중에서 phosphate 이온이 없는 M3배지와 potassium phosphate만 있는 M4배지 그리고 sodium phosphate만 있는 M5배지도 미생물 배양에 사용하였다. 캡슐배양시 캡슐의 용해를 방지하기 위하여 M1, M2 배지는 CaCl₂ 10g/L를 첨가하였고 M3, M4, M5배지는 CaCl₂ 5g/L를 첨가하였다. 실험에 사용된 ammonium mandelate는 암모니아수(28-29%) 1 ml당 L-mandelate 0.36 g을 첨가하여 1일간 상온에서 반응시켜 제조하였으며 각 배지 성분들은 분리하여 121℃에서 15분 동안 습식가열 멸균한후, Lamnar flow chamber에서 상온하에 완전히 식힌 후 혼합하여 사용하였다.

건조중량의 측정

미생물을 자유 배양했을 때와 캡슐 고정화 배양했을 때의 건조중량은 다음과 같이 측정하였다. 자유배양의 경우 균체가 배양된 배양액을 10 ml 추출하여 4000 rpm에서 10분간 원심분리하고 침전물을 100℃의 항온 건조기에서 무게의 변화가 없을 때까지 건조시킨 후 건조무게를 측정하여 건조중량으로 결정하였다. 캡슐 고정화 배양의 경우 미생물을 고정화한 캡슐과 고정화하지 않은 캡슐을 각각 배지에 넣어 일정시간 배양한 후, 각각에서 동일한 수의 캡슐을 100℃의 항온건조기에서 무게의 변화가 없을 때까지 건조시켜 그 무게 차이를 정량화하여 미생물의 건조중량으로 결정하였다.

고정화 방법

Cheong(5,6)의 calcium-alginate 캡슐 고정화법을 이용하여

Table 1. The composition of the growth media of *P. putida*. (KCTC 1751)

Medium(g/L)	M 1	M 2	M 3	M 4	M 5	M 6
Ammonium mandelate	3	3	3	3	3	-
Mandelate	-	-	-	-	-	3
Nitriloacetic acid	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.067	0.067	0.067	0.067	0.067	0.067
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002
KH ₂ PO ₄	3.4	3.4	-	3.4	-	3.4
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	6.7	6.7	-	-	6.7	6.7
Yeast extract	1.0	0.01	0.01	0.01	0.01	1.0
Beef extract	-	3	3	3	3	-
Peptone	-	5	5	5	5	-
Tryptone	-	15	15	15	15	-
NaCl	-	5	5	5	5	-
CaCl ₂	10	10	5	5	5	-

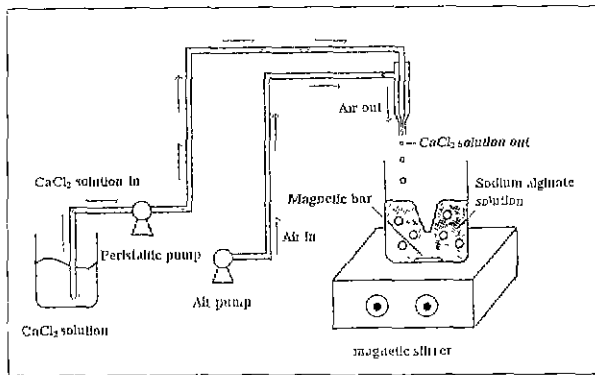


Figure 1 Schematic presentation of capsule formation system.

미생물을 캡슐내부에 고정화시켰다. 캡슐 제조 물질용액은 0.6%(w/v) sodium alginate 용액과 1.3%(w/v) CaCl_2 용액 liter 당 2.6g의 xanthan gum과 0.5g의 surfactant를 첨가하여 CaCl_2 혼합용액을 준비하였다. 캡슐을 제조전 습식가열 멸균된 성장매지 100ml에 균주를 접종하여 진탕배양기내에서 30°C에서 24시간동안 성장 배양시킨 배양액 10ml를 채취한 후, 4000rpm으로 원심분리하여 균주를 분리하였다. 분리한 균주를 100ml의 CaCl_2 혼합용액에 넣어 1시간 동안 완전히 현탁되게 혼합하였다. 캡슐의 오염을 방지하기 위해서 CaCl_2 혼합용액도 미생물 접종전에 autoclave로 121°C에서 15분간 멸균하였다 Figure 1과 같이 sodium alginate 용액을 잘 회전시키고 여기에 균주가 섞여있는 CaCl_2 혼합용액을 캡슐의 크기조절과 연속적으로 제조할 수 있도록 고안된 dispenser로부터 방울로 떨어뜨려서 미생물이 접종된 완전구형의 캡슐을 제조하였다 제조된 캡슐을 건져내어 증류수로 세척한 후 캡슐을 HEPES 완충용액(pH 7.2)에서 10분간 수축시킨 후 멸균된 각각의 배지에서 배양하여 전세포효소 고정화 캡슐을 제조하였다

고안된 dispenser 주위로 흐르는 기체의 유량속도를(약 6L/min) 조정함에 따라 캡슐의 크기를 조절할 수 있으며 형성된 캡슐을 sodium alginate용액에(약30초) 채취하는 시간에 따라 캡슐막의 두께를 조절할 수 있다 본 실험에서는 외경 2mm, 두께 0.1-0.2mm의 캡슐을 제조 사용하였다

GC 분석

본 실험에서 효소반응에 의해 생성된 생성물의 농도는 내부표준법을 적용하여 gas chromatography로 측정하였다. Gas chromatography는 HP 5890 Series II를 사용하였고 integrator는 HP 3396 Series II, column은 HP-1(Crosslinked Methyl Silicon Gum, 25m×0.2mm×0.11μm film thickness) 그리고 oven Temp 120°C, injection Temp. 150°C, detector Temp 200°C, carrier gas로는 He를 사용하였다. 또한 detector는 carrier gas중의 불순물에 의해서 감도에 별로 영향을 주지 않고 고감도 검출기로서 중심이 되며 광범위하게 실용화된 FID(Flame Ionization Detector)를 사용하였다.

본 실험에서는 정량분석으로 내부표준법을 채택하였으므로 내부표준물질로는 0.5ml의 cyclohexanone을 사용하였다(12,13) 반응용액에 측정하고자 하는 물질을 농도별로 첨가한 뒤 각각에 0.5ml씩의 cyclohexanone을 넣어준다. 그리고 8ml의 ether로

측정하고자 하는 물질과 cyclohexanone을 추출한 다음 G.C로 측정한다. 농도별로 측정하고자 하는 물질과 cyclohexanone간에 나타난 면적을 그 비로 나타내어 검량곡선을 구하였다.

전세포효소의 benzaldehyde 생산 활성 측정

Benzoylformate decarboxylase의 활성도는 Wilcocks등(12,13)에 의하여 제시된 방법을 적용하여 측정하였다. 각각의 배지에서 배양된 배양액 10ml를 4000rpm에서 원심분리한 다음 4ml의 반응용액(potassium phosphate buffer (pH 6.0) 200mM, TPP 0.1mM, benzoylformate (pH 6.0) 5mM)에 넣어 저온 진탕수조에서 30°C, 200rpm으로 일정시간 반응시킨 후 5분간 끓임으로 반응을 정지시켰다. 반응이 완료된 용액을 상온까지 냉각시킨 후, 내부표준물질 0.5ml를 첨가한 다음 8ml의 ether로 추출하여 생산된 benzaldehyde와 benzylalcohol의 농도를 GC 분석에서 언급된 방법 및 조건으로 하여 정량적으로 측정하였다. 캡슐의 경우에는 배양액 대신 100개의 전세포효소 고정화 캡슐을 사용하여 생성물의 농도를 측정하였다. 본 실험에서는 단위시간(min)당 1μmol의 benzaldehyde를 생산하는 효소의 양을 1 unit로 정의하였다.

결과 및 고찰

Ammonium mandelate와 Mandelate의 Benzaldehyde 생산활성에 미치는 영향 비교

G. Hegeman(10)은 inducer로서 mandelate를 이용한 배지를 사용하여 *P. putida* 균주로부터 benzoylformate decarboxylase를 생산하였고 R. Wilcocks(12)는 inducer로서 ammonium mandelate를 이용한 배지를 사용하여 *P. putida* 균주로부터 benzoylformate decarboxylase를 생산하였다. 본 실험에서는 ammonium mandelate가 포함된 M1배지와 mandelate가 포함된 M6배지에서 *P. putida* 균주를 각각 배양하여 ammonium mandelate와 mandelate가 benzaldehyde 생산활성에 미치는 영향을 살펴보았다.

Ammonium mandelate가 포함된 M1배지와 mandelate가 포함된 M6배지 각각에서 배양된 배양액을 원심분리하여 얻은 침전물을 효소반응시켜 반응시간에 따른 전세포 효소의 benzaldehyde 생산 농도와 전세포효소의 benzaldehyde의 비생산성을 Figure 2, 3에 나타내었다 M1배지에서 배양된 미생물의 건조중량은 약 1.44 g/L 이었고 M6배지에서 배양된 미생물의 건조중량은 약 0.93 g/L 이었다

Mandelate가 포함된 M6배지보다 ammonium mandelate가 포함된 M1배지에서 미생물의 건조중량이 약 1.5배 높게 나타났으며 benzaldehyde 생산 농도도 역시 M1의 배지에서 배양된 경우에 약 52% 높게 나타났다 M1, M6배지에서 자란 미생물의 benzaldehyde 미생산성은 오차 범위 내에서 같은 것으로 나타났다.

배지조성에 따른 미생물 성장 속도

Inducer로서 mandelate 대신 ammonium mandelate를 사용하여 미생물의 성장 속도를 살펴 보았다. M1배지 조성중 calcium alginate캡슐에 chelating agent로 작용하는 phosphate 이온이 다량으로 함유되어 있어 미생물을 캡슐로 고정화시켜 배

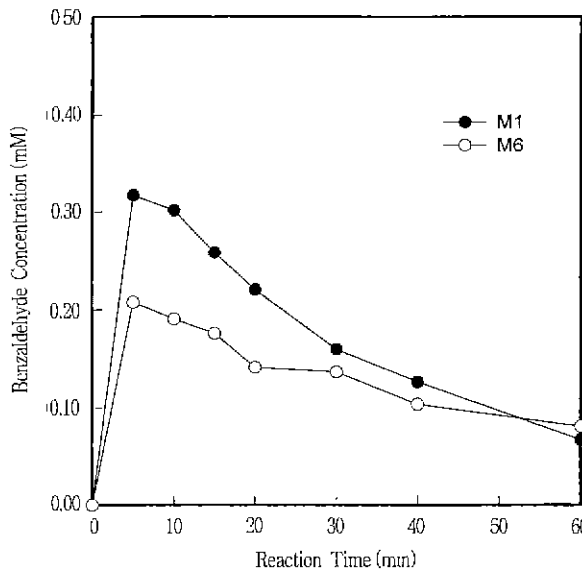


Figure 2. Time courses of biotransformation of benzoylformate into benzaldehyde by cells grown on media (M1,M6) with different inducers.

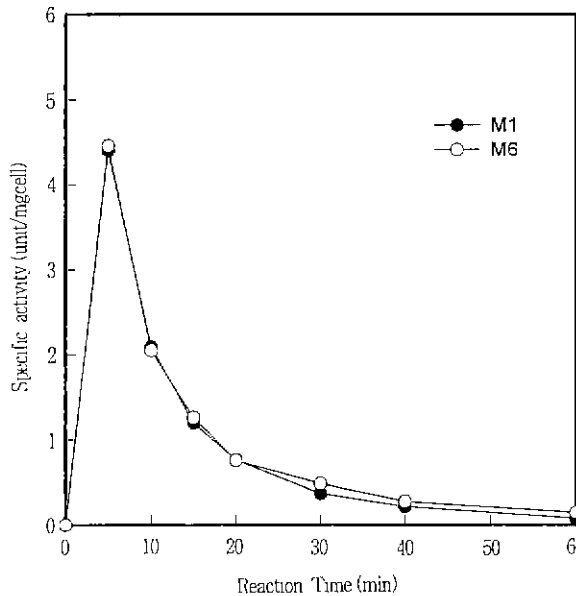


Figure 3. Comparison of specific benzoylformate decarboxylase activity in cells grown on media(M1, M6) with different inducers

양할 때 캡슐이 용해된다. 따라서 본 실험에서는 미생물의 고농도 배양이 가능하며, 캡슐에 고정화된 미생물의 배양시 캡슐의 용해를 방지하기 위하여 M2, 3, 4, 5배지로 미생물을 배양한 후 M1배지에서 배양한 경우의 성장양태와 비교하였다.

M1, 2, 3, 4, 5배지에서 각각 계대배양된 액을 5 ml 취하여 pH가 7인 각각의 100 ml에 접종한 다음 배양하였다. 배양도중 1, 2시간마다 배양액 10 ml를 채취하여 원심분리하여 얻은 침전물의 건조중량을 측정하여 그 변화를 Figure 4에 나타내었다. M1배지에서 배양된 미생물의 건조중량은 배양 10시간 후 약 1.2 g/L로 일정하게 나타났다 이에 고농도의 세포배양액을 얻

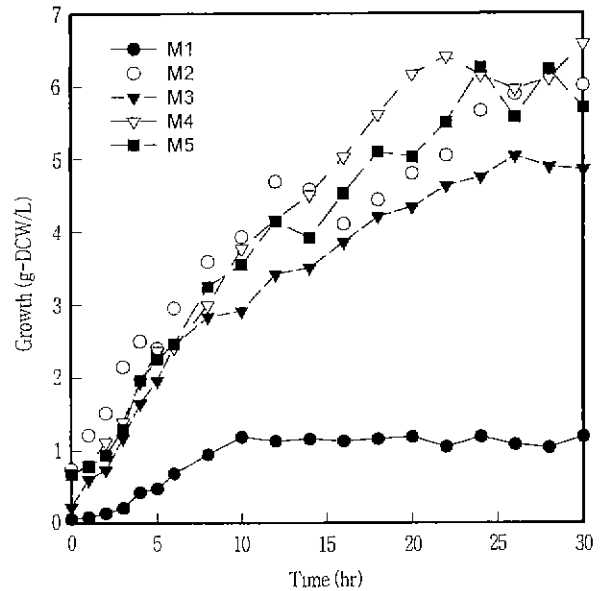


Figure 4. The effect of medium composition on the growth of *P. putida* in the free culture

기 위하여 M1배지에 LB배지의 영양분을 포함시킨 M2배지를 사용한 결과 1일간 배양된 미생물의 건조중량은 약 6 g/L에 도달하였다. 이는 LB배지의 영양분이 포함되지 않은 M1배지로 배양한 미생물의 건조중량에 비교하여 약 5배 증가했다. 또한 캡슐에 미생물을 고정화하여 배양하는 경우 phosphate 이온이 캡슐을 녹이는 역할을 하므로 M2배지의 영양분중 sodium phosphate와 potassium phosphate를 뺀 M3배지에서 약 1일간 배양한 결과 미생물의 건조중량은 약 5 g/L에 달하였으며, M2배지 중에서 sodium phosphate를 제거한 M4배지와 potassium phosphate를 제거한 M5배지를 사용하여 각각 약 1일 자유배양한 결과 미생물의 건조중량은 약 6 g/L에 달하였다. 이같은 결과로 볼 때 배지 성분중 phosphate를 제외하는 경우 미생물의 성장량이 약 17 % 감소하는 것을 알 수 있다

따라서 M1배지에 LB배지를 첨가하므로 미생물의 성장량을 5배 증가시킬 수 있으며, 배지에 phosphate가 존재하므로 추가적인 미생물 성장량의 증가를 보였다 또한 Figure 4에서 볼수 있듯이 M1배지에서 배양하는 경우와는 달리 각 배지에서 배양하는 경우 지연기는 거의 나타나지 않았으며 약 24시간의 배양 후 정지기를 나타내었다 이는 M2, 3, 4, 5배지가 M1 배지에 비해 미생물의 성장에 필요한 탄소원이나 질소원과 같은 growth factor에 대한 절대적 투입량이 많으므로 지연기가 아주 짧아졌으며 더 늦게 정지기에 도달한 것으로 사료된다.

자유배양 전세포효소의 benzaldehyde 생산 활성

미생물의 배양에 이용되는 배지조성에 따라서 미생물의 성장뿐 아니라 이들이 생산하는 효소의 활성도 달라질 수 있다. 전세포효소의 생산에서 단위 체적당 미생물의 농도를 높이는 것만이 중요한 것이 아니라 미생물 내부에 축적되는 단위 미생물당 효소의 양도 중요하다. 따라서 각각의 조성이 다른 배지에서 배양하는 경우의 전세포효소의 활성을 검토하는 것이 필요하다.

본 실험에서는 Table 1에 나타난 각각의 배지에 대하여 배양

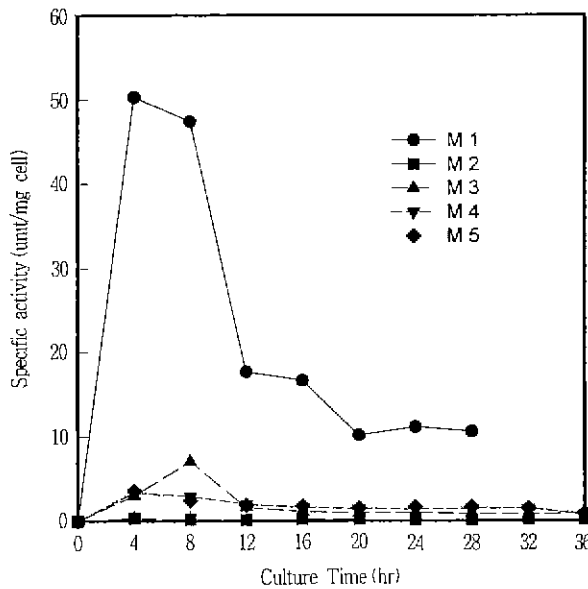


Figure 5. The effect of medium composition on the specific activity of whole cell enzyme prepared in the free culture

시간에 따른 전세포 benzoylformate decarboxylase의 활성 변화를 조사하였다. 각 배지에서 배양된 배양액 10 ml를 채취한 후 원심분리하여 얻어진 침전물을 반응용액과 혼합하여 5분간 반응시킨 후 전세포 효소의 benzaldehyde 생산활성을 Figure 5에 나타내었다.

Figure 4에서 알 수 있듯이 M1 배지에서 배양하는 경우 미생물의 건조중량이 가장 작았다. 그러나 전세포효소의 비활성도는 Figure 5에 도식된 것 처럼 M1배지에서 배양된 전세포 효소의 활성이 다른 배지에서 배양된 것 보다 10배 이상 높게 나타났다 이것은 LB배지를 첨가한 M 2, 3, 4, 5 배지에서는 탄소원, 질소원등 영양분이 많으므로 배양중 미생물이 효소를 생산하기보다는 오히려 균체 자신의 성장을 위해서 배지를 사용한 것으로 사료된다. 또한 모든 배지에 대하여 배양시간이 길어짐에 따라 전세포 효소의 활성도가 감소하였으며, 배양 4-8시간에 가장 높은 활성을 나타냈다. 이것은 배양시간이 길어짐에 따라 효소의 활성을 저해하는 배양조건으로 배양환경이 변화하기 때문인 것으로 사료된다. 실제 pH가 7인 완충용액이 포함된 M1 배지라도 배양후 24시간이 지나면 pH가 약 7.5로 되었는데 이러한 pH 변화도 효소의 실활에 영향을 끼친 것으로 사료된다. 일반적으로 *P. putida* 균주로부터 얻어진 효소는 mandelate를 탄소원과 에너지원으로 사용하여 mandelate pathway에 참여하는 것으로 알려져 있다(10). 본 실험에서는 미생물을 배양하기 위한 배지조성에 mandelate 대신 ammonium mandelate를 사용하였는데 미생물 배양중 mandelate 성분과 암모니아 성분이 분리되어 mandelate 성분은 mandelate pathway를 거치게 되며 암모니아의 성분은 일부가 질소원으로서 미생물에 흡수되고 나머지는 배양액속에 배출되어 pH가 증가한 것으로 사료된다.

자유배양 전세포효소의 반응 시간에 따른 benzaldehyde 생산 활성

M1배지에서 배양된 배양액을 10ml 채취하여 원심분리된 전세포 효소를 benzaldehyde 생산활성의 측정하기 위해 반응용액

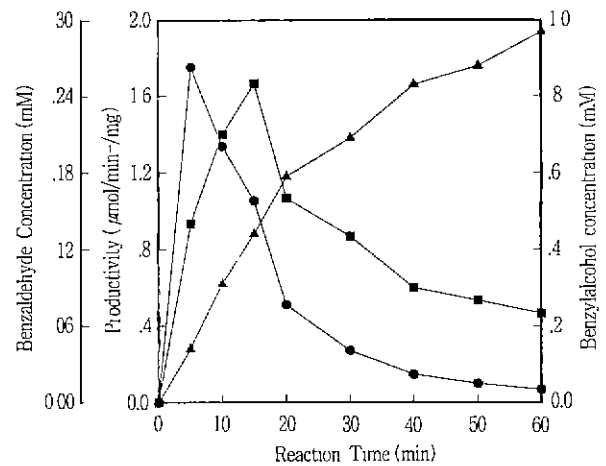


Figure 6. Profiles of benzaldehyde and benzylalcohol concentration and the productivity of the whole cell enzyme during the reaction on benzoylformate. (●), productivity; (■), benzaldehyde concentration; (▲), benzylalcohol concentration.

과 혼합한 뒤 반응시켜 전세포 효소에 대한 생산활성을 측정하여 Figure 6에 도식하였다. 전세포 효소에 의한 benzaldehyde의 생산성은 효소 반응시간이 지남에 따라 증가하다가 반응시간 5분에 최대값을 나타내고 5분이 경과하면 전반적으로 감소하는 것을 알 수 있다 이것은 Figure 6에서 볼 수 있듯이 생성된 benzaldehyde가 benzylalcohol로 전환되기 때문에 반응시간 5분에 가장 높은 productivity를 가짐을 알 수 있다.

일반적으로 미생물은 배지의 종류나 배양조건에 따라서 생성되는 효소가 달라지며 또한 한 종류 이상의 효소가 존재한다. R. Wilcocks 등(1992)은 benzoylformate decarboxylase에 의해서 생성된 benzaldehyde가 *P. putida*내에 존재하는 또 다른 효소, 즉 *P. putida* oxido-reductase에 의해서 benzylalcohol로 전환되는 것으로 보고한 바 있다(12,14-16). 본 실험에서는 *P. putida*로부터 생산되어진 *P. putida* oxido-reductase의 활성이 benzoylformate decarboxylase의 활성보다 우수하여 반응 중 생성된 대부분의 benzaldehyde가 반응시간이 지남에 따라 benzylalcohol로 전환되는 것으로 사료된다. 순수한 benzoylformate decarboxylase를 사용하여 위와 같은 실험을 한 결과 benzylalcohol은 전혀 검출되지 않았다. 따라서 이후의 실험에서 전세포효소의 benzaldehyde 생산 활성 측정시 반응시간은 5분으로 결정하였다.

다중 배지의 직렬 이용에 따른 미생물의 성장양태 및 benzaldehyde 생산

미생물이 고정화된 캡슐을 배양할 때 캡슐 내부에 미생물을 고농도로 배양하고 높은 활성을 지닌 효소를 얻는다는 것은 매우 중요하다. 따라서 본 실험에서는 미생물의 균체량을 최대로 늘임과 동시에 효소의 활성을 높이기 위해서 자유배양시 미생물의 건조중량이 높게 측정되는 M5배지와 효소의 활성이 가장 높게 측정되는 M1배지를 사용하여 배양중 배지의 교환에 따른 미생물의 건조중량의 변화를 살펴보았다. Figure 4에서 조성이 다른 각각의 배지에서 미생물의 성장양태를 살펴본 결과 M2, 4, 5

의 배지에서 성장한 미생물의 건조중량은 M1배지에서 성장한 미생물의 건조중량의 약 5배에 달하였다. 따라서 미생물을 M5 배지에서 배양하다 M1의 배지로 전환시키는 경우와 처음의 배지로 단순 배양하는 경우의 성장속도를 비교해 보았다

M5배지에서 1일간 배양한 후 배양액 50 ml를 채취하여 새로운 M1, M5 배지용액 50 ml와 각각 혼합한 후 배양시간에 따른 미생물의 건조중량의 변화를 Figure 7에 나타내었다. 미생물의 건조중량은 배지를 새로 바꾸고 난 후부터 측정하였다. 미생물을 M5배지로 단순 배양하는 경우가 M5배지에서 배양하다 M1 배지로 전환하는 경우에 비해 미생물의 성장속도도 빠르고 건조중량도 약 1.5배정도 높게 측정되었다. 미생물을 M5배지에서 단순 배양한 경우 M1배지에서 배양한 경우에 비해 미생물의 건조중량이 약 5배 높게 측정되었다 따라서 단순히 M1배지에서 배

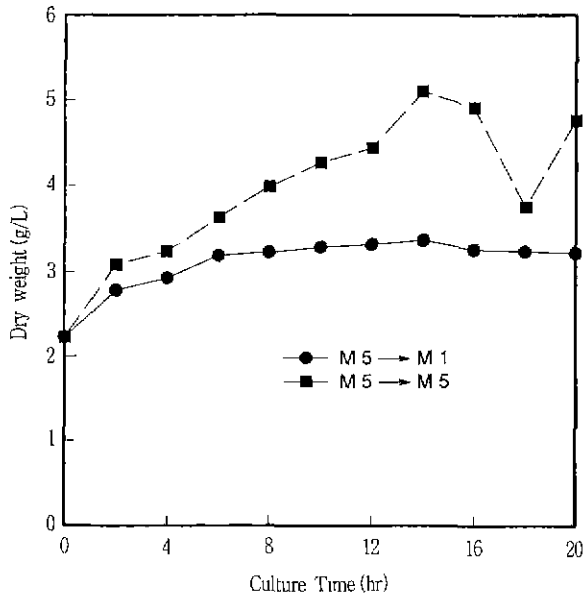


Figure 7. The effect of medium transition on the dry weight of free cultivated cell.

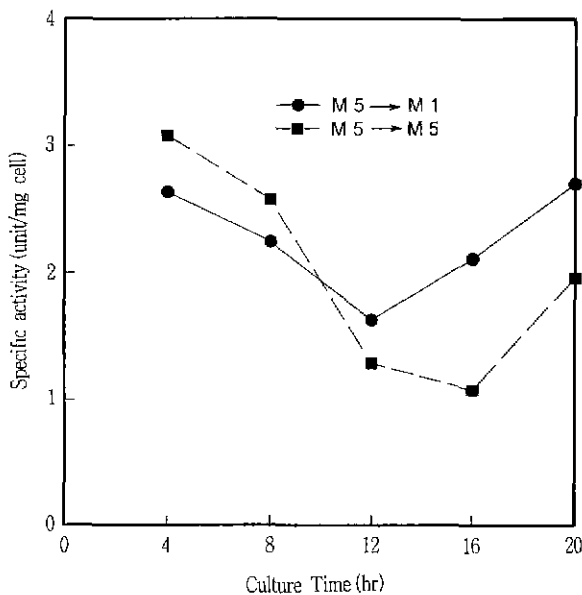


Figure 8 The effect of medium transition on the specific activity of the whole cell enzyme prepared in the free culture.

양하는 것보다 M5배지에서 배양하다 M1배지로 전환시키는 경우 미생물의 건조중량을 약 3배 높일 수 있다.

미생물 배양중 배지의 교환에 따른 전세포효소의 benzaldehyde 생산 활성을 조사하였다. 캡슐고정화 미생물을 M5배지에서 배양한 후 배양액 50 ml를 채취하여 새로운 M1배지와 M5배지 50 ml에 각각 접종하여 배양하였다 배양 후 4시간마다 배양액 10 ml를 채취하여 원심분리한 후 생성된 침전물로 효소 반응을 시켰다. 배지 교환후 배양시간에 따른 전세포효소의 benzaldehyde 생산 활성의 변화를 Figure 8에 나타내었다. 배지 교환 후 처음 약 10시간까지는 M5배지에서 배양하다 M1배지로 전환하는 경우가 M5배지로 단순 배양하는 경우에 비해 낮은 비활성도를 보이나 10시간 이후에는 높은 비활성도를 보였다.

배지용액의 양에 따른 미생물의 성장양태 및 효소활성

본 실험에서 사용된 *P. putida* 균주는 배양시 산소를 필요로 하는 호기성 균주이다. 특히 산소공급은 미생물의 성장뿐만 아니라 효소의 활성에도 영향을 끼치는 데 현재까지의 보고에 의하면 *E. coli* 고정화 캡슐의 경우 산소공급 반응기 사용시 진탕 배양기의 사용에 비해 건조중량은 25 %, β -galactosidase의 생산량은 58 % 증가된 것을 알 수 있다(17).

이에 본 실험에서는 pH 7인 M5배지용액에서 계대배양한 배양액을 새로운 M5배지용액 200 ml와 300 ml가 각각 담긴 플라스크(500 ml)에 역량 대비 5%(V/V)씩 접종한 뒤 shaking incubator에서 30°C, 200 rpm의 조건으로 배양하여 배양시간에 따른 미생물의 건조중량과 생산된 전세포 효소의 활성을 측정하여 Figure 9에 도식하였다. Figure 9에서 볼 수 있듯이 동일한 배양조건에서 200 ml의 배지를 사용하여 배양한 경우가 300 ml의 배지를 사용하여 배양한 경우보다 성장한 미생물의 건조중량이 높게 측정되었다. 또한 생산된 전세포 효소의 비활성은 Figure 5에서 경우와 유사하게 배양 4시간에 가장 높게 나타났으며, 단위 부피당 효소의 활성은 200 ml에서 배양된 경우에 더 높음을 알 수 있다. 이것은 200 ml의 배지를 사용했을 경우 300 ml의 배지를 사용했을 때보다 용액 단위부피당 공기와 접촉하는 면적이

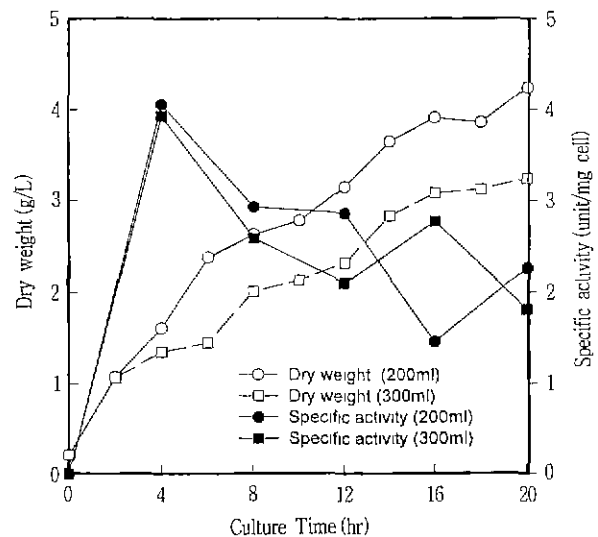


Figure 9. Effect of oxygen transfer rate (the ratio of medium volume and nominal volume of flask) on the growth and specific enzyme activity.

넓어진다. 즉 삼각 플라스크를 shaking하지 않은 상태에서 배양액과 공기가 접촉하는 면적을 측정해 보면 200 ml의 배지를 사용할 경우에는 84.05 cm²이 되었고 300 ml의 배지를 사용할 경우에는 64.6 4cm²이 되었다. 따라서 기-액 계면적(cm²/cm³)인 a는 배지의 양이 200 ml인 경우 300 ml에 비해 약 2배가 되었다 이처럼 산소전달의 효과가 커지므로 균체 성장량이 많아진 것으로 사료되며, 이에 생산된 전세포 효소의 양도 증가한 것으로 사료된다.

다중 배지의 직렬 이용에 따른 캡슐고정화 미생물의 성장양태 및 benzaldehyde 생산

미생물 고정화 캡슐을 M5배지로 배양할 때 캡슐내부 및 캡슐막의 변형으로 인하여 캡슐내부에 미생물을 고농도로 배양할 수 없었다. 따라서 캡슐내 미생물을 고농도로 배양하기 위하여 미생물이 고정화된 캡슐을 phosphate 이온의 성분이 없는 M3배지에서 충분히 배양시킨 다음 캡슐 고정화 미생물의 성장속도는 낮지만 자유배양시 benzaldehyde 생산활성이 가장 높게 측정되는 M1배지로 교환하여 배양시켰다 미생물이 집종된 캡슐 300개를 pH 7인 M3배지 100ml에서 24시간씩 3회 배양한 후 다시 pH 5인 M1배지 100ml에서 배양하였다. 배지에 첨가된 CaCl₂의 농도는 M3배지의 경우 5 g/L 이고 M1배지 경우에는 10 g/L이다. 특히, M1배지는 배지중 phosphate 이온의 성분이 약 10 g/L가 포함되어 있으므로 캡슐의 용해를 방지하기 위해서 배지에 10 g/L의 CaCl₂를 첨가해 주었으며 calcium phosphate 염을 방지하기 위해서 배지의 pH를 5로 보정 하였다

실험결과 M3배지에서 3일간 배양한 후 다시 M1배지에서 1일간 배양한 미생물 고정화 캡슐의 건조중량은 77.75 g/L가 되었으며 2일간 배양한 경우에는 건조중량이 크게 증가하여 142.54 g/L이 되었다. 건조중량이 갑자기 증가하는 이유를 찾고자 캡슐의 표면을 관찰하였다. M1에서 2일, 3일간 배양하면 투명하던 캡슐막이 점차 불투명해지면서 단단해지며 캡슐 내부의 미생물양은 크게 늘지 않았다. M3배지에서 3일간 배양 후 다시 M1에서 1일간 배양된 캡슐내부의 미생물은 자유배양된 균주에 비해 크기가 작아지고 구의 형태로 이루어진 미생물이 눈에 띄기 시작한다. *Pseudomonas putida*균주는 growth phase와 nongrowth phase사이의 transition phase동안에 실린더 형태에서 작은 구 형태로 모양을 바꾼다고 보고된 바 있다(18). 즉, 캡슐 고정화 미생물이 M1배지에서 2,3일이 지나면 캡슐막에 의한 산소 및 물질 전달 저항으로 인하여 캡슐내부에서 starvation이 발생하고 잘 밝혀지지 않은 고분자물질을 생산하였거나 배지용액중의 염이 막에 부착된 것으로 사료된다.

미생물이 집종된 캡슐 300개를 취하여 pH 7인 M3배지에서 3일간 배양하고 다시 pH 5인 M1배지에서 1일간 배양한 후 효소반응을 시켰다 효소 반응은 캡슐 100개를 사용하여 측정하였으며 캡슐의 용해를 방지하기 위하여 potassium phosphate buffer대신 succinate-NaOH buffer를 같은 농도로 사용하였다. 이에 생산된 전세포 고정화 효소에 의해 생산된 benzaldehyde와 benzylalcohol의 농도와 고정화 전세포 효소의 생산성을 Figure 10에 도식화 하였다 Figure 10에서 보는 바와 같이 효소의 생산성은 40분 이후에 평형에 도달하였으며, 미생물 고정화 캡슐을 배양하는 동안 *P putida* oxido-reductase의 실활이 일어나 benzoylformate decarboxylase에 의해 생성된 benzal-

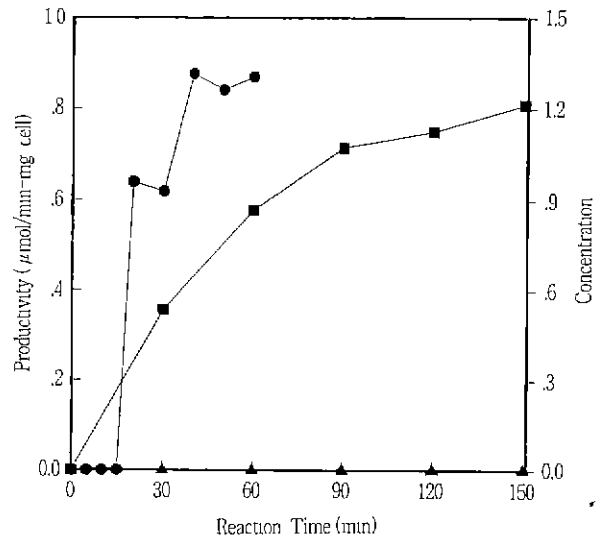


Figure 10 Profiles of benzaldehyde and benzylalcohol concentration and the specific productivity of the encapsulated whole cell enzyme during the reaction on benzoylformate (●), productivity; (■), benzaldehyde concentration; (▲), benzylalcohol concentration.

dehyde가 benzylalcohol로 전환되지 않은 것으로 사료된다. 미생물 고정화 캡슐을 효소 반응시켰을 경우 반응시간 40분에 나타난 비활성도는 자유 배양시 5분에 나타난 비활성도에 비해 약 1/2의 값을 보였다 이러한 결과는 캡슐 막에 의한 물질전달저항으로 인하여 비활성도의 최대값이 나타나는 반응시간이 연장되었으며 비활성도도 낮아진 것으로 사료된다.

캡슐 고정화 전세포효소의 반복사용에 따른 benzaldehyde 생산 활성

일반적으로 benzaldehyde와 같은 유기용매는 미생물 효소의 활성을 떨어뜨린다고 알려져 있다. 그러나 본 실험에서 사용되어진 미생물 고정화 캡슐의 경우 미생물에 의해서 생성된 효소는 캡슐 막으로 인하여 효소 반응으로 생성된 benzaldehyde로부터 보호될 수 있다. 따라서 본 실험에서는 캡슐 고정화 전세포효소의 활성도 측정을 반복 실험함으로써 유기용매로부터 효소의 실활을 막을 수 있는 고정화 캡슐의 특성을 살펴보았다.

M3배지에서 24시간씩 3회 배양한 후 다시 M1배지에서 1일간 배양된 캡슐 100개를 사용하였다 Benzaldehyde의 생산 활성 측정시 반응시간은 40분이었으며 succinate-NaOH buffer를 사용하였다. 반응이 끝난 후 캡슐을 그냥 방치해두면 효소 반응시 생성된 benzaldehyde의 영향으로 캡슐 막이 일부 녹으면서 캡슐끼리 서로 엉기게 되어 캡슐 막의 손상을 초래한다. 이러한 현상을 방지하기 위해서 반응이 종료된 캡슐은 상온에서 CaCl₂ 5g/L가 포함된 succinate-NaOH buffer 200mM에 보관하였다.

실험결과 재사용 후 처음 3회까지는 비활성도가 처음에 비해 약 20%정도 급격히 떨어졌으며 이후 서서히 감소하는 경향을 Figure 11로부터 알 수 있다. 일반적으로 효소는 저온에서 안정하나 *Pseudomonas arvilla*가 생산하는 metapyrocatechase는 산소의 존재하에서 아주 불안정하며, pH 7.5, 4 °C에서 24시간 이내에 80 %이상이 실활되는 효소로서, 이 실활은 SH 시약의

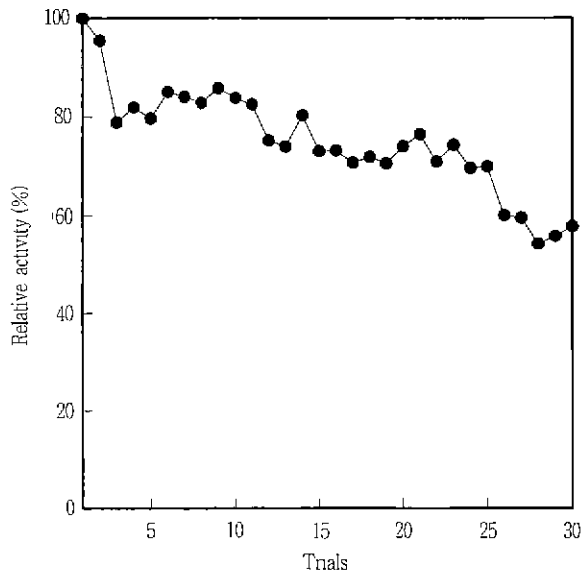


Figure 11. The preservation of encapsulated whole cell enzyme converting benzoylformate to benzaldehyde.

공존하에서도 전혀 보호될 수 없었으며, 혐기적인 보존에서는 부분적인 보호는 되었지만 특이적인 안정화제를 찾을 수 없었다. 그러나 저농도의 유기용매(10 % acetone 혹은 ethyl alcohol)의 공존하에서는 산소의 존재하에서도 효소가 완전하게 보호된다는 것이 발견되어, 10 % acetone 존재하에서 효소를 정제하여 dioxygenase로서는 최초로 결정화에 성공한 것으로 보고된 바 있다(19). Benzoylformate decarboxylase도 앞에서 보고된 바와 같이 효소반응중 생성된 benzaldehyde와 같은 유기용매로 인하여 서서히 실활이 되어 30회 재사용 이후에 비로소 약 40 %의 실활을 나타낸 것으로 사료된다. 또한 캡슐 재사용 30회 이후 미생물의 건조중량은 약 10 %의 감소를 보였다. 초기에 구의 형태를 이루던 캡슐이 3회사용까지 계속 줄어들어 찌그러든 타원형을 이루며 30회 재사용후에도 그 형태를 계속 유지하였다. 이러한 현상은 캡슐 내부에 많은 양의 미생물이 차지 않아서 내부에 빈 공간이 존재하기 때문인 것으로 사료된다. 실제로 본 실험에서 사용된 캡슐고정화 *P. putida* 균주의 건조중량은 100 g/L 이하이었으며 앞으로 최적배양조건을 더 조사하면 건조중량은 더 높아질 수 있을 것이다.

요 약

Mandelate pathway를 거치는 *Pseudomonas putida*(KCTC 1751)의 전세포 benzoylformate decarboxylase를 이용하여 benzoylformate를 benzaldehyde로 변환하였고 성장배지의 조성이 cell 내부에 축적되는 benzoylformate decarboxylase의 양에 미치는 영향을 조사하였다. 전세포효소의 재사용을 위하여 calcium-alginate 캡슐 고정화법을 이용하여 캡슐고정화 *Pseudomonas putida*를 제조하였다. 캡슐 고정화 미생물을 M3배지에서 3일간 배양한 후 M1배지에서 1일간 배양한 결과 77.75 g/L의 미생물 건조중량을 얻었다. 캡슐 고정화 전세포 benzoylformate decarboxylase의 비활성도는 자유배양에 의한 전세포효소의 비

활성도에 비해 약 1/2값을 나타내었으며 캡슐 고정화 전세포 benzoylformate decarboxylase를 20회 재사용시 약 20 %의 실활을 보였으며 캡슐 재사용 30회 이후 미생물의 건조중량은 약 10 % 감소를 보였다.

감 사

본 연구는 생물공정 연구센터의 연구비 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Jones, J. B. (1986), Enzyme in organic synthesis, Tetrahedron, 42, 3351-3403.
2. Ku, K., M. J. Kuo, J. Delente, B. S Wildi, and J Feder (1981), Development of a hollow-fiber system for large-scale culture of mammalian cells, Biotechnol. Bioeng, 23, 27
3. Buchholz, K. (1979), Characterization of immobilized biocatalysis, Dechema monographs, 86. Verlag chemie, Weinheim.
4. Chang, H. N., G. H. Seong, I. K. Yoo, J. K. Park, and J H Seo (1998), Method for immobilization of whole microbial cells in calcium alginate capsules, US Patent 5,766,907.
5. Cheong, S. H., J. K. Park, B. S. Kim, and H. N. Chang (1993), Microencapsulation of yeast cells in the calcium alginate membrane, Biotechnology Technique, 7, 879-884.
6. Cheong, S. H., T. J. Lee, J. K. Park, and H. N. Chang (1995), L-Lysine Production Using Encapsulated *Corynebacterium glutamicum*, J KICHE, 33, 105-112.
7. Chang, H. N., G. H. Seong, I. K. Yoo, J. K. Park, and J. H. Seo (1996), Microencapsulation of Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Cells with Invertase Activity in Liquid-Core Alginate Capsules, Biotechnol. Bioeng, 51, 157-162
8. Lee, B. H. and J. K. Park (1996), Encapsulation of whole cell β -Galactosidase of *Escherichia coli*, Kor J Biotechnol. Bioeng, 11, 398-404.
9. Park, J. K., K. S. Cheong, and H. N. Chang (1997), The Effect of Oxygen Transfer on the Activity of encapsulated whole cell β -Galactosidase, Bioproc Eng, 17, 197-202.
10. Hegeman, G. D. (1966), Synthesis of the enzymes of the mandelate pathway by *Pseudomonas putida*, J. Bacteriol, 91, 1140-1167.
11. Shimao, M., T Nakamura, A Okuda, and S. Harayama (1996). Characteristics of transposon insertion mutants of mandelic acid-utilizing *Pseudomonas putida* strain A10L, Biosci. Biotech. Biochem., 60 (7), 1051-1055.
12. Wilcocks, R. and O. P. Ward (1992), Factors affecting 2-hydroxypropiophenone formation by benzoylformate

- decarboxylase from *Pseudomonas putida*, Biotechnol. Bioeng, 39, 1058-1063.
13. Wilcocks, R., O. P. Ward, S. Collins, N. J. Dewdney, Y. Hong, and E. Prosen (1992), Acylon formation by benzoylformate decarboxylase from *Pseudomonas putida*, Appl. Environ. Microbiol., 58, 1699-1704.
 14. Long, A. and O. P. Ward (1989), Biotransformation of benzaldehyde by *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnol Bioeng., 34, 933-941.
 15. Nikolova, P. and O. P. Ward (1991), Production of L-phenylacetylcarbinol by biotransformation product and by-product formation and activities of key enzymes in wild-type and ADH isoenzyme mutants of *Saccharomyces cerevisiae*, Biotechnol Bioeng., 38, 493-498.
 16. Ward, O. P. and C. S. Young (1990), Reductive biotransformations of organic compounds by cells or enzymes yeast. Enz. Microbial Technol, 12, 482-493.
 17. Duffy, K. J. and R. M. Ford (1997), Turn angle and run time distributions characterize swimming behavior for *Pseudomonas putida*, J. Bacteriol, 179, 1428-1430.
 18. Givskov, M., L. Eberl, and S. Molin (1994), Responses to nutrient starvation in *Pseudomonas putida* KT2442. Two-dimensional electrophoretic analysis of starvation and stress-induced proteins, J Bacteriol., 176, 4816-4824.
 19. Oh, C. Y. and J. K. Park (1998), The characteristics of encapsulated whole cell β -galactosidase, Bioproc Eng, In Press.