

미생물유래 Transglutaminase의 생산을 위한 생물반응기 운전 조건 확립

이화정, 유재수, 전계택*, 정용섭

전북대학교 응용생물공학부, 강원대학교 생명과학부*

전화 (0652) 270-2571, FAX (0652) 270-2572

abstract

Experimental studies on the effects of impeller to provide the microbial transglutaminase derived from *Streptoverticillium mobaraense* have been conducted. The optimal production medium was determined by latin-square design, and the effects of aeration and agitation were observed by using different sizes and shapes of impellers for the production of transglutaminase. The effects of pH and temperature were also evaluated for the production of transglutaminase in flasks. As a result, pH is more effective than temperature for both enzyme production and growth of the microorganism. The peak enzyme activity for transglutaminase in fermenter was 0.7 U/mL, but this was still well below the average enzyme activity, 1.3 U/mL, obtained in flask runs.

서론

동식물 또는 미생물에 의해 생산되는 Transglutaminase는 단백질의 가교중합화, 탈아미드화 반응, 단백질이나 펩타이드에 1차 아민기를 부가시켜주는 반응 촉매효소로서 식품의 영양가치와 gel상 식품 및 면류의 물성 및 저장기간을 증가시키고 향미와 외관을 향상시키는 기능을 가지고 있다. 또한 혈액을 응고시키며 이로 인한 상처치료등으로 의학분야에서도 이용 가능성을 보이고 있다(1-4). 초기 Guinea-pig의 간에서 Transglutaminase를 생산하였으나, 가격이 고가이며 Ca⁺ 의존성 효소라는 단점이 있다. 그러므로 저비용으로 대량생산 가능성이 있는 미생물로부터 효소를 생산하는 연구가 진행되고 있다(3). 본 연구에서는 *S. mobaraense*를 균주로 사용하여 Transglutaminase를 생산하는 생물반응기 운전 조건을 확립하고자 한다.

재료 및 방법

본 연구에서 사용한 균주는 *Streptoverticillium mobaraense*(ATCC 29032)이다. 동결건조된 균을 bacto agar 배지에 도말하여 27°C에서 5-7일 키운 후 형성된 포자를 성장배지에 접종하여 30°C에서 교반하면서 3일간 배양하였다. Glycerol과 배양균 현탁액(3:7, v/v) 10 mL liquid stock culture를 만들어 -20°C에서 저장하였으며, 종배

양시마다 새로운 liquid stock을 사용하였다. 성장배지 성분은(1) glucose 0.5 g/L, MgSO₄ 0.1 g/L, K₂HPO₄ 0.2 g/L, proteose peptone 0.2 g/L이었으며 초기 pH 7.0으로 30°C, 250 rpm에서 3일간 진탕배양하였다. 이때 250 mL플라스크를 사용하여 80 mL 배지에 liquid stock 4 mL를 접종하였다. Transglutaminase 생성을 위하여 성장배지에서 배양한 균을 생산배지에 접종(5%)하였으며, 생산배지 성분은(1-4) soluble starch 2 g/L, MgSO₄ 0.1 g/L, K₂HPO₄ 0.2 g/L, proteose peptone 2 g/L, yeast extract 0.2 g/L, PPG(polypropyleneglycol) 0.05 g/L이었다. 이때 배양 조건은 성장배지와 동일하며 4일간 배양하였다. 실험 분석으로는 건조균체질량(dry cell weight)을 측정하였고 효소활성은 J. E. Folk(5) 방법을 보완해서 측정하였으며 Lowry(6) 방법을 이용하여 단백질 함량을 측정하고 비활성을 계산하였다. 전분 분석은 Dubois(7) 방법을 보완하여 측정하였고 DNS 시약을 이용하여 환원당 분석을 하였다. 본 실험에서 이용된 실험계획법 및 실험분석은 라틴방격법과 SAS, 반응표면분석으로 하였다.

결과 및 고찰

Transglutaminase의 고생산을 위해 배지 최적화 실험을 플라스크 배양에서 하였다. 동일 조건에서 탄소원, 질소원, 인원을 달리하였을 경우의 효소생산성을 비교하여 높은 수율의 영양원을 선정하고 조합 실험하였다. glucose, proteose peptone, NaH₂PO₄ · 2H₂O의 영양원 조합이 1.37 U/mL로 가장 높은 효소생산성을 나타내었다. 이때의 조합원의 농도를 달리하여 농도 최적화 실험을 행한 결과 탄소원은 50 g/L, 질소원은 20 g/L, 인원은 1 g/L일 때 효소생산성이 높았다. 이 결과로부터 구한 최적화배지의 조성은 soluble starch 50 g/L, proteose peptone 20 g/L, NaH₂PO₄ · 2H₂O 1 g/L, MgSO₄ 1 g/L, yeast extract 2 g/L, PPG 0.5 g/L이었다(8). 배지조성외에 미생물의 배양 및 효소생산성에 영향을 미치는 통기, 교반, pH, 온도에 관하여 플라스크와 발효조에서 실험을 하였다. 발효조에서 초기 pH 7.0으로 조절하고 발효시 pH를 7.0으로 일정하게 유지한 경우와 조절하지 않은 경우에 대해 발효조 실험을 한 결과 전자의 경우 최대 0.33 U/mL를 후자는 최대 0.23 U/mL를 나타내었다. 통기실험은 250 mL 플라스크에 배양부피를 달리 하였을 경우 배양부피가 가장 적은 30 mL에서 1.53 U/mL, 배양부피 100 mL가 1.54 U/mL로 상대적으로 공기의 공급량이 많은 경우 효소생산이 높았으며 이때의 균체량은 12 g/L로 전반적으로 비슷하였다. 발효시 교반속도와 임펠러의 크기 및 형태에 따른 효소생산성을 비교 실험하였다. 교반속도를 300, 400, 500 rpm으로 달리한 결과 400 rpm에서 효소활성은 48 hr 전후에서 0.69 U/mL로 다른교반속도의 효소활성에 비해 다소 높았다. 임펠러의 형태로는 pitched blade impeller와 rushton trutbin impeller가 실험에 이용되었으며 크기는 rushton turbin impeller를 D_i:D_b:D_w:D_d의 비가 각각

1:0.24:0.2:0.64(이때 $D_r=6.6$ cm), 1:0.25:0.22:0.61(이때 $D_r=8.1$ cm)인 임펠러를 사용한 결과를 Fig. 1, 2, 3에 나타내었다(9). 임펠러의 교반날개의 숫자가 많고 직경과 날개의 크기가 클수록 발효조내 공기분산능력 및 균체, 배지의 혼합이 더욱 좋게되어 효소생산이 향상되는 것을 관찰하였다. 최적화배지, 발효조건 30°C , pH 7.0, 400 rpm, 1 vvm와 $D_r:D_b:D_w:D_a$ 의 비가 1:0.25:0.22:0.61인 rushton turbin impeller를 사용하여 1.5 L 배양부피에 균 5%를 접종하여 114 hr 배양한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 최대 효소활성은 78 hr에 0.96 U/mL로 기본배지를 사용한 이전 실험결과와 비교할 때 효소생산이 약 1.4배 높았다. 발효조의 pH 및 온도 최적화를 위해 플라스크배양에서 pH 및 온도에 관한 실험을 수행한 결과 pH 7, 33°C 에서 최대 1.77 U/mL를 나타내었다. 반응표면분석결과 회귀모형은 $y=1.55+0.07x_1-0.57x_2+0.05x_1^2-0.00007x_1x_2-0.48x_2^2$ (이때 x_1 ; 온도, x_2 ; pH)으로 온도가 5°C 증가할때마다 활성은 0.07(U/mL)만큼 증가하며, 초기 pH가 2 증가할때마다 활성은 0.57만큼 감소하였다. 반응면은 온도에 대해 변화가 완만하고 pH가 낮을수록 효소활성이 좋은 경향을 나타내고 있으며 Fig. 5에 도시하였다. 실험한 온도와 pH 범위에서, 발효후 효소의 최종 활성은 온도의 변화보다 pH의 변화에 영향을 받는 것으로 나타났다.

요약

호기성 균주인 *Streptoverticillium mobaraense*에 의해 생산되는 Transglutaminase의 고수율을 위한 실험을 하였다. 라틴방격법에 의해 실험을 설계하여 최적 배지를 확정하였고, 호기성 균주인만큼 공기공급을 위한 통기 및 교반이 중요하게 작용됨을 관찰하였다. 이를 위해 임펠러의 형태 및 크기에 관한 실험을 수행하였고, 향후 부피산소공기전달 속도를 vvm과 교반속도에 따라 측정하도록 할 것이다. 또한 미생물의 증식 및 효소생산성에 미치는 온도 및 pH의 조건에 대해 실험한 결과 온도보다는 산성 및 중성에서의 pH가 효소생산성에 높은 영향을 미치고 있다. 플라스크 배양에서 평균적으로 1.3 U/mL 활성의 효소생산이 가능했으며 동일조건의 발효조 배양시 0.7 U/mL로 생산성이 감소하였다.

참고문헌

1. H. Ando, et. al. (1989), *Agric. Biol. Chem.*, **53**(10), 2513.
2. Y. Zhu, et. al. (1995), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **44**, 277.
3. Y. Zhu, et. al. (1996), *Biotechnol. and Bioeng.*, **50**, 291.
4. U. Gerber, et. al. (1994), *Biol. Chem.*, **299**, 825.
5. J. E. Folk (1970), H. Tabor and C. W. Tabor(ED), **17**, 889-894, Academic press, New York.
6. C. H. Sulter (1985), a Practical Guide to Enzymology, Wiley Interscience, 31-32.
7. M. Dubois, et. al. (1956), *Anal. Chemistry*, **28**, 350.

8. 이화정 외 2인 (1999), 한국산업미생물학회 추계학술발표대회, P-212, 269.
 9. J. M. Lee (1992), Biochemical Engineering, 241, Prentice Hall, New Jersey .

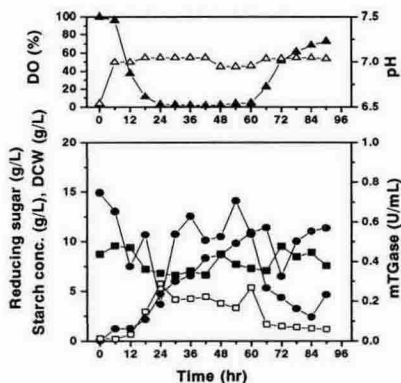


Figure 1. Time course of cell growth, starch concentration, mTGase activity in batch culture of *S. mobaraense* at 400 rpm with rushton turbin impeller(2.5L), pH 7.0, 1 vvm, 30 °C and 5% inoculum.
 ●—DCW, ■—mTGase, ●—starch, □—sugar, ▲—DO, △—pH

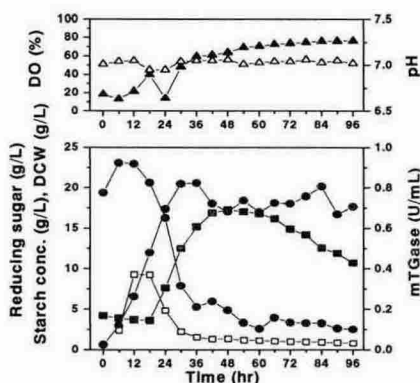


Figure 2. Time course of cell growth, starch concentration, mTGase activity in batch culture of *S. mobaraense* at 400 rpm with rushton turbin impeller(5L), pH 7.0, 1 vvm, 30 °C and 5% inoculum.
 ●—DCW, ■—mTGase, ●—starch, □—sugar, ▲—DO, △—pH

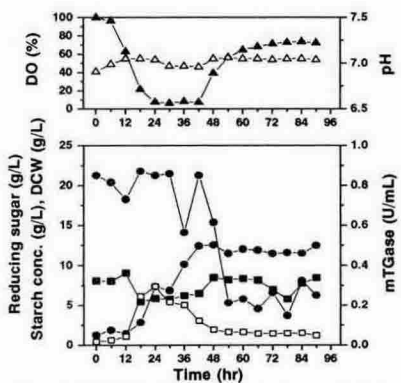


Figure 3. Time course of cell growth, starch concentration, mTGase activity in batch culture of *S. mobaraense* at 400 rpm with pitched blade impeller(5L), pH 7.0, 1 vvm, 30 °C and 5% inoculum.
 ●—DCW, ■—mTGase, ●—starch, □—sugar, ▲—DO, △—pH

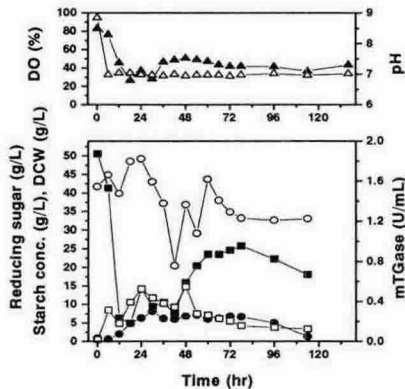


Figure 4. Time course of cell growth, starch concentration, mTGase activity in designed culture of *S. mobaraense* at 30 °C and 5% inoculum.
 ●—DCW, ■—mTGase, ○—starch, □—sugar, ▲—DO, △—pH

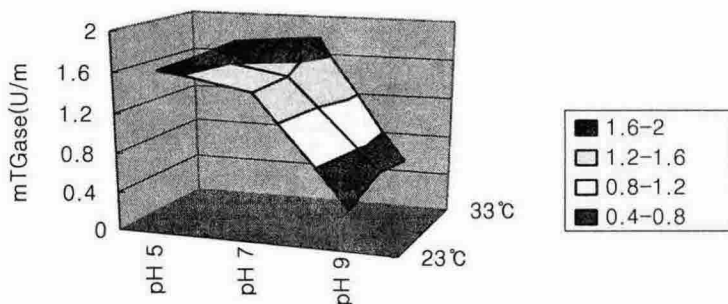


Figure 5. Response surface analysis of enzyme activity obtained in flask culture.