

Calcium Alginate 에 포괄된 Yeast Invertase 의

고정화 효소에 관한 연구

(II. 고정화 효모의 효소학적 특성)

방병호 · 이상건 · 양철영

서울보건전문대학 부설 한국보건과학연구소

(1989.11.20 수리)

Calcium Alginate-entrapped Yeast Whole-cell Invertase

(II. Enzymatic Properties of the Immobilized Cells)

Bang, Byung Ho, Sang-Gun, Lee and Cheul-Young, Yang

Korea Institute of Health Research, Seoul Health

Junior College, Seoul Korea

(Received November, 20, 1989)

ABSTRACT

A strain of *Saccharomyces cerevisiae* BY-366 was isolated to produce a strong sucrose-hydrolyzing enzyme. After entrapment of yeast cell invertase with alginate, enzymatic properties of immobilized cells were investigated. The results are as follows.

1. The optimum pH of invertase in immobilized cells and non-immobilized cells was 6.0 and 5.0, and pH stability of invertase in immobilized cells and non-immobilized cells was 6.0 and 5.0, respectively.
2. Activation energy of immobilized cells was 4.7 kcal/mol.
3. The immobilized preparation exhibited high resistance to heat and urea induced denaturation.
4. The bead size less than 2 mm in diameter was desirable.
5. In spite of repeated use, the enzyme activity of immobilized cells was inhibited slightly in batch reaction, and a small column of the immobilized preparation could hydrolyze relatively high concentration of sucrose almost quantitatively to more than 6 days.

이 논문은 1988년도 문교부 학술연구조성비 지원에 의하여 연구되었음.

I. 서 론

설탕을 포도당과 과당으로 분해하여 생성되는 전화당은 설탕보다 감미가 높고 비결정성이기 때문에 식품공업이나 제과공업에서 대단히 많이 사용되고 있다¹⁾.

효소적으로 전화당 생산을 위하여 사용되는 invertase 는 대부분이 유리상태로 이용되고 있으며, 보다 저렴한 가격으로 사용하기 위해서 yeast invertase 를 이용한 고정화효소에 관한 연구가 많이 보고되고 있으며 총설로 발표되기도 하였다^{2~3)}.

최근의 국내외 연구 동향을 살펴보면 효소의 정제와 성질⁴⁾, 효소의 생성과 조절^{5~7)}, 연속배양을 이용한 효소생산⁸⁾, 그리고 corn grits⁹⁾, gelatin^{10~12)}, agar¹³⁾, titanium activated inorganic supports¹⁴⁾, polyethylene-coated cotton cloth¹⁵⁾, macroporous polystyrene¹⁶⁾, concanvalin A-sepharose¹⁷⁾, clay¹⁸⁾, polyacrylamide¹⁻⁹⁾, carrageenan²⁰⁾, 등의 지지체를 이용한 효소의 고정화에 관한 연구가 진행되고 있다.

미생물 세포의 물리적인 결합에 근거를 둔 포괄(entrapment)에 의한 고정화는 agar, polyacrylamide, carrageenan, alginate 들을 사용하고 있다. Polyacrylamide gel 에 의한 방법은 중합시 많은 열을 발생시켜 세포의 효소활성을 저해하고 세포에 상당히 독성을 끼치며, 불규칙한 형태를 가지는 단점이 있다. Carrageenan gel 은 세포고정화 공정중 비교적 높은 온도가 요구되므로 저온에서 증식하는 세포에는 이용되기 어려우며, 담체에 세포를 많이 포괄시킬 수 없는 단점이 있다. Alginate gel²¹⁾에 의한 방법은 고정화 공정이 간단하고 세포에 독성을 끼치지 않으며, 값이 싸고 기질용액의 높은 주입속도에 대해서도 내압축성, 내마모성이 크다는 등 여러 가지 장점을 지니고 있다.

본 연구에서는 효모인 *Saccharomyces cerevisiae* BY-366 세포를 calcium alginate 로 포괄고

정화시켜, intact cell 의 효소와 고정화효소의 여러가지 성질 및 안정성의 비교·검토, reactor 를 이용한 연속반응에 관한 연구를 하여 실제 산업에의 이용방안을 모색하고자 실험을 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 사용균주 및 배양

전보²²⁾에서 분리한 *Saccharomyces cerevisiae* BY-366 을 이용하였으며, 균체 생산을 위한 배지로 sucrose 3%, bactopectone 0.5%, yeast extract 0.3%, K₂HPO₄ 0.1%, MgSO₄ · 7 H₂O 0.05%로 구성된 기본배지(pH 5.0)를 사용하였다.

2. 세포고정화 과정

Kierstan 와 Bucke 씨 방법²³⁾에 따라서, 60 시간 배양한 균체를 증류수로 여러번 세척하고 wet cells 10 g 을 1% sodium alginate 50 ml 에 현탁하여 주사기에 넣고 0.05 M CaCl₂ 용액에 적하하여 calcium alginate 로 세포가 고정화된 bead 를 만들 수 있었다. 이 용액(bead 가 들어 있는 0.05 M CaCl₂ 용액)을 4°C 로 하여 1 시간 숙성(curing)시킨 후, 고정화 bead 를 증류수로 세척하여 0.05 M CaCl₂ 용액에 다시 넣어 4°C 에서 보관하여 본 실험에 사용하였다.

3. 효소반응

회분식 반응(batch reaction)에 있어서 intact cell 의 효소활성은 0.1 M phosphate buffer (pH 6.0) 0.5 ml 와 0.1 M sucrose (initial concentration) 용액 0.5 ml 에 세포현탁액(0.25 g wet cell/ml) 1 ml 을 혼합하여 40°C 에서 30 분간 water bath 상에서 진탕반응시킨 후 여과하여 여액으로 환원당을 정량, 효소활성을 측정하였다. 고정화 세포의 경우에도 효소활성은 위와 똑같은 방법으로 측정하였으며 고정화 세포의 농도는 intact cell 의 0.25 g 에 준하는 세포를

취하였다.

연속식 반응(continuous reaction)에 사용된 반응기는 외부에 heating coil 이 부착된 glass column(1.6 cm×18 cm)으로 30 ml 의 고정화세포를 채워 packed-bed reactor 로 만들어 사용하였다. 기질용액은 peristaltic pump 로 일정한 속도로 column 밑부분으로 공급하여 윗부분으로 반응액을 수집하였으며 기질용액을 column 에 공급하기전에 예열 coil 을 통하여 column 내의 온도로 조절후 공급하였다. 반응물은 방출용액(effluent)의 환원당의 농도를 측정하여 계산하였다. 환원당은 전보²²⁾에서 설명한 DNS 법으로 측정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 효소활성에 미치는 pH 의 영향

Intact cell 과 immobilized cell 의 invertase 활성에 미치는 pH 의 영향을 조사하기 위하여 batch 반응으로 검토한 결과는 Fig. 1 과 같다. 즉 intact cell 의 효소는 pH 5 부근에서 최고의

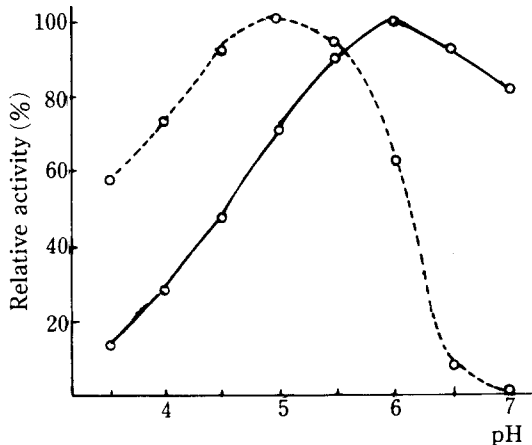


Fig. 1. Effect of pH on the invertase activity
 ○···○ : intact whole-cell invertase
 ○—○ : immobilized whole-cell invertase
 All experiments were carried out at 40°C in 0.1 M-McIlvaine buffer.
 Highest enzyme activity was taken as 100.

활성을 나타내었으며, 그 이상의 pH 에서는 급격히 효소활성이 떨어졌지만 고정화세포의 효소 활성은 intact cell 의 최적활성 pH 보다 약간 높은 pH 6.2 였으며 그 이상의 pH 에서도(약 pH 7.0 까지) 활성은 서서히 떨어짐을 알 수 있었다.

2. pH 의 안정성

Intact cell 의 invertase 와 immobilized cell 의 invertase 의 pH 안정성을 검토하기 위해 pH 2.0~7.0 까지는 0.1 M-McIlvaine buffer 를, pH 7.0~10.0 까지는 Atkins-antin buffer 를 사용하여 재료 및 방법에서 설명한 회분반응기를 이용하여 2 시간동안 반응시킨 결과로부터 잔존활성을 비교 검토하였다(Fig. 2). Fig. 2 에서 보는 바와 같이 intact cell 의 invertase 활성은 pH 5.0 부근에서, immobilized cell 의 invertase 활성은 pH 6.0 부근에서 각각 다른 안전한 pH 범위를 나타내 주었다. 이 결과는 각 효소들의 최적활성을 나타내는 범위가 그들의 안전한 pH 범위라는 사실을 입증하여 준다.

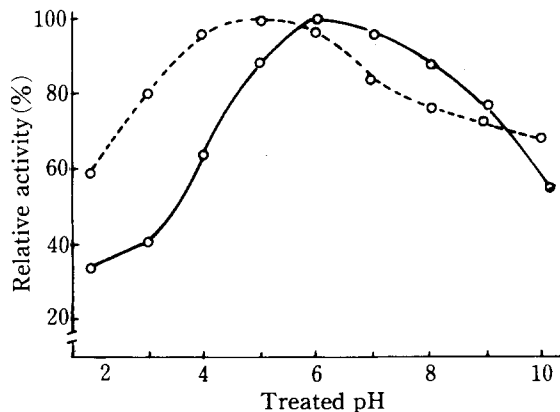


Fig. 2. pH stability of the invertase
 ○···○ : intact whole-cell invertase
 ○—○ : immobilized whole-cell invertase
 All experiments were carried out at 40°C for 2 hr.
 Buffers used were ; 0.1 M-McIlvaine buffer for pH 2.0~7.0, and Atkins-Pantin buffer for pH 7.0~10.0.
 Highest enzyme activity was taken as 100.

3. 효소의 활성화 에너지

30°C~60°C 사이에서의 Arrhenius plot에 의한 immobilized cell 의 invertase 의 활성화 에너지 (activation energy) 는 4.7 kcal/mole 이었다 (Fig. 3).

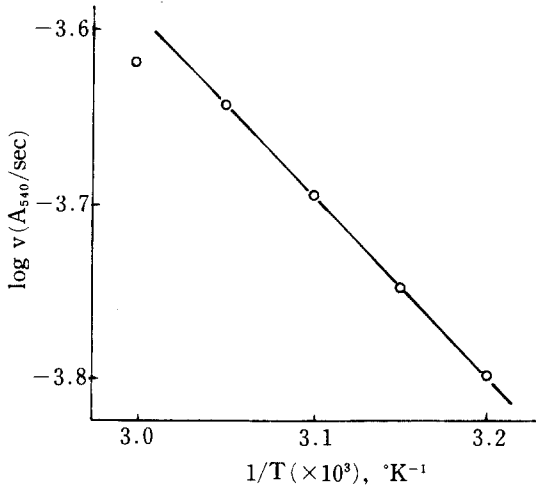


Fig. 3. Effect of temperature on the immobilized invertase activity.

The enzyme activities were assayed at temperature between 30°C and 60°C.

4. 효소의 열안정성

기질과 반응하기 전에 효소 (intact cell invertase 와 immobilized cell invertase) 를 60°C 에서 10 분에서 120 분까지 열처리한 후 효소활성의 변화를 조사한 결과는 Fig.4 에서와 같다. 즉 intact cell 이나 immobilized cell 의 invertase 의 활성이 열처리 시간이 길어짐에 따라 효소 활성도 서서히 떨어졌지만 immobilized cell 의 효소활성은 intact cell 의 효소활성에 비해 상당히 안정하였다.

5. 효소활성에 미치는 요소의 영향

Intact cell 과 immobilized cell 의 invertase 의 활성에 미치는 요소 (urea) 의 영향을 검토하

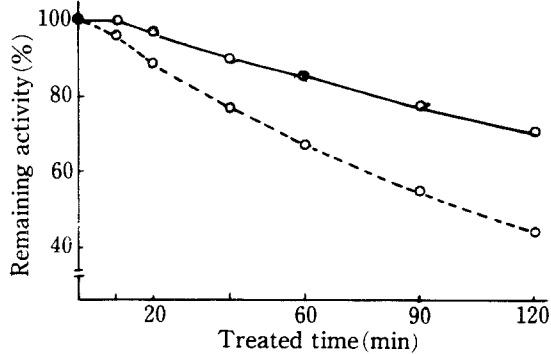


Fig. 4. Thermal stability of the invertase.

Each enzyme was preincubated at 60°C from 10 minutes to 120 minutes, immediately cooled and assayed about residual activity.

기 위하여 40°C 에서 2 M-urea 에 120 분까지 처리한 후 그 잔존활성을 측정하였다. 그 결과 intact cell 의 invertase 는 40°C 에서 10 분처리 로 그 활성이 40%나 감소하였으며, 120 분 후에는 약 70%까지 활성이 떨어졌다. 한편, immobilized cell 의 invertase 의 활성은 60 분이 지난 후에 40% 정도 감소하는 것으로 보아 고정화 효소가 urea 에 훨씬 안정함을 볼 수 있었다 (Fig. 5).

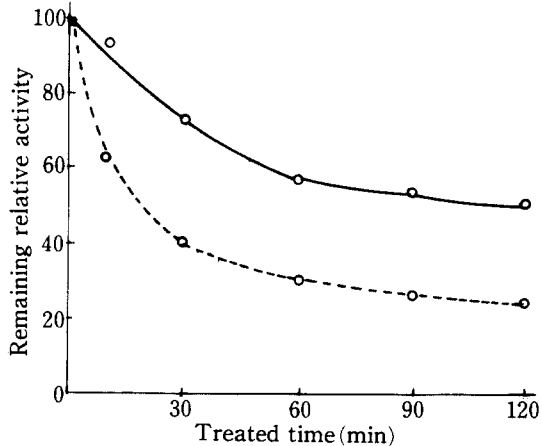


Fig. 5. Effect of urea on the stability.

○···○ : intact whole cell invertase

○—○ : immobilized whole-cell invertase

Each enzyme was pretreated in 2 M-urea at 40°C, immediately, centrifuged and assayed about residual activity.

6. Sucrose 가수분해에 미치는 bead의 크기의 영향

Fig. 6에서와 같이 bead의 크기가 본 효소의 활성에 영향을 주었다. 즉 효소반응액에 들어간 효모의 수는 대략 같은 조건에서 bead의 크기가 감소함으로써 효소활성은 증가하였다. 이는 bead의 크기가 작을수록 부피에 비하여 높은 표면적을 가지며, 또한 bead의 크기가 작을수록 bead 내로의 확산저항이 작기 때문이다.

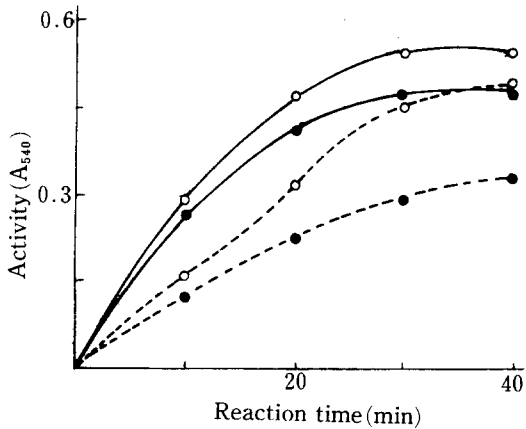


Fig. 6. Effect of bead size on the sucrose hydrolysis.

- : bead diameter ; 1.5 mm
- : fiber diameter ; 1.5 mm
- ...○ : bead diameter ; 2.5 mm
- ...● : bead diameter ; 3.5 mm

7. 회분식 반응회수에 따른 고정화 효소의 안정성

재료 및 방법에서 언급한 회분식 반응에서 1회 반응후 고정화 효소의 활성을 측정한 후 이 효소를 다시 buffer로 씻고 회분 배양에 30회까지 반복 사용하였다. Fig. 7에서 보는 바와 같이 회분반응 5회까지는 거의 효소활성이 100% 유지되다가 10회 사용에서 18%, 20회에서 40%, 30회에서 50%까지 그 활성이 감소하였다.

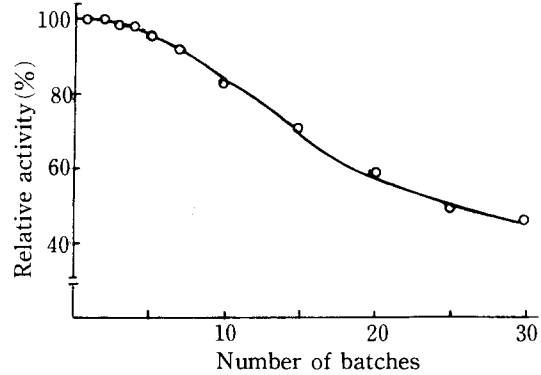


Fig. 7. Stability of the immobilized whole-cell invertase in repeated batch reaction.

After the termination of batch reaction, the beads recovered from the reaction mixture by filtration and washed with buffer was used repeatedly in successive batch reaction.

8. 연속식 반응기 방식에 의한 sucrose의 가수분해

재료 및 방법에서 설명한 방법으로 고정화 세포로 packed-bed reactor를 만들어 peristaltic pump로 포준기질을 계속 공급함과 동시에 반응기 밖으로 반응용액을 연속적으로 뽑아내어 반응기 내의 액체의 부피를 일정하게 유지하면서 반응을 수행했다. Fig. 8에서 보는 바와 같이 기질의 공급속도가 25 ml/hr에서부터 250 ml/hr로 증가할수록 sucrose의 가수분해가 증가하였다. 즉 기질용액의 공급속도가 250 ml/hr일 때, 시간당 6.3 mM의 sucrose가 가수분해되었다.

9. 연속식 반응에 있어서 고정화 효소의 안정성

고정화 효소로 연속식 반응기에서 기질을 일정량으로 공급하여 (flow rate : 300 ml/hr) 6일 동안 sucrose의 가수분해율을 측정한 결과는 Fig. 9와 같다. 즉 효소의 활성이 6일까지 안정함을 보여 주었다.

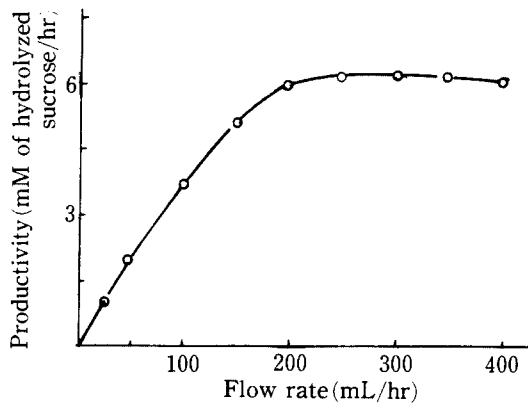


Fig. 8. Effect of flow rate on the productivity of continuous packed-bed reactor.

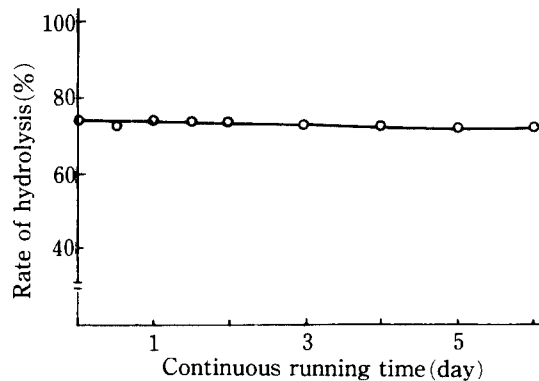


Fig. 9. Stability of immobilized whole-cell invertase in continuous operation.

Substrate solution was continuously fed at constant flow rate (300 ml/hr).

IV. 요약

효모 균원으로부터 invertase 의 생산력이 강한 *Saccharomyces cerevisiae* BY-366 을 분리하고, 이 균을 calcium alginate 로 고정화한 후 효모의 효소학적 성질을 검토한 결과는 다음과 같다.

1. 고정화 효소와 비고정화 효소의 최적 pH 는 각각 6.0, 5.0 이었고, 고정화 효소와 비고정화 효소의 pH 안정성도 각각 6.0, 5.0 으로 나타났다.

2. 고정화 효소의 활성화 에너지는 4.7 kcal/mol 이었다.

3. 고정화 효소의 열안정성은 비고정화 효소에 비하여 훨씬 안정하였고, 또한 urea 대한 안정성도 비고정화 효소에 비하여 훨씬 안정하였다.

4. Alginate 고정화 세포는 그 지름의 2 mm 이하로 했을 때 효소활성이 가장 높았다.

5. 고정화 균체의 회분반응시 10 회 이상 사용으로 활성이 20% 정도의 감소를 보였으며 연속식 반응에서 sucrose 의 가수분해율은 반응물 유출속도가 250 ml/hr 일 때 가장 높았고, 6 일까지 연속반응 시켰을 때도 그 효소의 활성은 그대로 존속되었다.

V. 참고문헌

- Goldstein, H., P.W. Barry, A.B. Rizzuto, K. Venkatasubramanian and W.R. Vieth : *J. Ferment. Technol.*, **55**, 516-524 (1977).
- Wiseman, A. : "Topics in enzyme and fermentation biotechnology" Vol. 3, ed.A. Wiseman, pp. 267-288, Ellis Horwood Ltd. (1979).
- Scott, C.D. : *Enzyme Microb. Technol.*, **9**, 66-73 (1987).
- Bugbee, W.M. : *Can. J. Microbiol.*, **30**, 1326-1329 (1984).
- Mormeneo, S., and R. Sentandreu : *J. Bacteriol.*, **152**, 14-18 (1982).
- Chu, F.K., and F. Maley : *J. Biol. Chem.*, **255**, 6392-6397 (1980).
- Mortatte, M.P.L., H.H. Sato and Y.K. Park : *Biotechnol. Lett.*, **5**, 229-232 (1983).
- Vitolo, M., M.L.R. Vairo and W. Borzani : *Biotechnol. Bioeng.*, **30**, 9-14 (1987).
- Monsan, P., and D. Combes : *Biotechnol.*

- Bioeng.*, 26, 347-351 (1984).
10. Parascandola, P., and V. Scardi : *Biotechnol. Lett.*, 3, 369-374 (1981).
 11. Parascandola, P., and V. Scardi : *Biotechnol. Lett.*, 4, 753-758 (1982).
 12. Gianfreda, L., P. Parascandola and V. Scardi : *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 11, 6-7 (1980).
 13. Toda, K., and M. Shoda : *Biotechnol. Bioeng.*, 17, 481-497 (1975).
 14. Dias, S.M.M., J.M. Novais, J.M.S. Cabral : *Biotechnol. Lett.*, 5, 203-208 (1983).
 15. Yamazaki, H., R.K.H. Cheok and A.D. E. Fraser : *Biotechnol. Lett.*, 6, 165-170 (1984).
 16. Mansfeld, J., and A. Schellenberger : *Biotechnol. Bioeng.*, 29, 72-78 (1987).
 17. Iqbal J., and M. Saleemuddin : *Enzyme Microb. Technol.*, 7, 175-178 (1985).
 18. Lopez Santin, J., C. Sola and J.M. Lemma : *Biotechnol. Bioeng.*, 24, 2721-2724 (1982).
 19. Abbott B.J. : In : Perlman D(ed) Annual reports on fermentation processes, Vol 1. Academic Press, New York, San Francisco, London, pp. 205-233 (1977).
 20. Francou N. and P.M. Vignais : *Biotechnology Letters*, 6(10), 639-644 (1984).
 21. Cheetham, P.S.J., K.U. Blunt and C. Bucke : *Biotech. Bioeng.*, 21, 2155 (1979).
 22. Bang, B.H, S.G, Lee and C.Y, Yang : *Korea J. Food and Nutr.*, 2(2), Publishing
 23. Kierstan M. and C. Bucke : *Biotechnology and Bioengineering. Vol XIX*, pp. 387-397 (1977).