

Brevibacterium sp. CH1의 분리 및 특성

장호남* · 이처영 · 황준식¹

한국과학기술원 화학공학과 ¹국방과학연구소

Isolation of *Brevibacterium* sp. CH1 and Properties of Its Enzyme

Chang, Ho-Nam*, Cheo-Young Lee and Jun-Sik Hwang¹

Department of Chemical Engineering, KAIST, P.O. BOX 131, Seoul, Korea

¹Agency for Defense Development, Taejon

A bacterial strain of *Brevibacterium* sp. CH1 was isolated and used to produce an enzyme (nitrile hydratase) necessary for carrying out the bioconversion of acrylonitrile to acrylamide. The culture and reaction conditions, and medium optimization were studied for the strain. The conversion yield was nearly 100% with a trace amount of acrylic acid produced. The strain showed strong activity of nitrile hydratase toward acrylonitrile and extremely low activity of the amidase toward acrylamide. We sought optimum culture conditions for the formation of nitrile hydratase by *Brevibacterium* sp. CH1. The effects of temperature and pH on the activity of free and immobilized cells were investigated. The nitrile hydratase of *Brevibacterium* sp. CH1 acted not only on various aliphatic nitriles such as acrylonitrile, propionitrile and acetonitrile, but also on aromatic nitrile as nicotinonitrile.

최근에 미생물 및 효소의 이용분야에 비천연물(유기합성품)에 대한 미생물반응으로 환경정화 및 물질생산의 양면에 다양한 연구가 진행되고 있다. 그중에 니트릴 화합물에 작용하여 아마이드류를 생성하는 미생물이 자연계에 존재한다는 보고가 다수 있다(1-6).

아크릴아마이드는 제지산업의 지력증강제 및 응집제로 중요하며 폐수처리, 오일회수 및 토목공사 등에 다양하게 사용되고 있다.

아크릴아마이드의 생물학적 생산방법은 미생물을 배양하여 얻어지는 nitrile hydratase 효소를 이용하여 아크릴로니트릴을 생변환시키는 것으로 다음과 같은 장점이 있다. 첫째, 아크릴로니트릴로부터 아크릴아마이드의 전환율이 높아서(99.9%) 미반응 아크릴로니트릴의 분리회수가 불필요하여 회수 및 정제조작이 간단하다. 둘째, 수화반응은 저온 및 상압하에서 수행하므로 고온, 고압 등의 불활성 분위기를 요구하지 않으므로 장치 등의 구조설계가 용이하고 조작운전의 안정성이 높다. 셋째, 아크릴아마

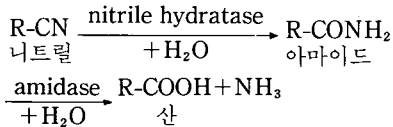
이드의 고선택성(selectivity, 99.9%)으로 미량의 아크릴산 생성 이외의 부산물이 거의 없어 분자량이 큰 고분자를 만들기에 적합한 좋은 품질의 아크릴아마이드를 얻을 수 있다.

Nocardia, *Brevibacterium*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus* 등 여러 종류의 박테리아가 니트릴을 연속적으로 그에 대응하는 아마이드와 카르복실산으로 변환시킬 수 있다는 것을 발표하였다(1-6). *Nocardia*에 의한 아세토니트릴의 물질대사가 Digerioimo 등에 의하여 연구되었다(1). Asano 등은 nitrile hydratase 활성을 가진 *Pseudomonas chlororaphis*를 분리, 효소생산의 kinetics를 연구하였으며, nitrile hydratase가 아크릴로니트릴, 아크릴아마이드 및 시아나이드에 의해 저해(hibition) 반응을 발표하였다(3, 4, 7). Fradet 등은 *Brevibacterium* A4로부터 추출하여 부분적으로 정제한 nitrile hydratase를 이온교환수지로 고정화하여, 이 고정화 효소를 충전층 반응기에 충전 후 효소반응시켜 프로피온아마이드 생산실험을 수행하였다(8).

Key words: *Brevibacterium* sp. CH1, isolation, nitrile hydratase, bioconversion, acrylonitrile, acrylamide

*Corresponding author

Brevibacterium sp. CH1 은 문헌에 보고된 니트릴을 변화시키는 균주들처럼 니트릴의 수화과정에 두 개의 효소를 가진다. 하나는 nitrile hydratase 로 수용성 니트릴을 그에 대응하는 아마이드로 변환시키는 효소와 amidase 로 아마이드를 그에 대응하는 산과 암모니아로 변환시키는 효소이다. 이들 효소가 작용하는 전체적인 반응식은 다음과 같다.



Nitrile hydratase 의 비활성이 amidase 의 비활성보다 상당히 크기 때문에 거의 100%의 아크릴로니트릴이 아크릴아마이드로 전환되며, 미량의 아크릴산을 제외한 부산물의 생성이 없다.

생물학적 방법에 의한 아크릴아마이드의 생산을 위해서 nitrile hydratase 의 활성이 있는 미생물을 분리해야 한다.

따라서 본 연구에서는 nitrile hydratase 활성이 있는 *Brevibacterium* sp. CH1 을 분리하였으며 이 균에서 nitrile hydratase 의 생산을 위한 배지의 최적화, 배양 및 본 효소의 반응조건의 최적화, 기질특이성 등에 대해 알아보았다.

재료 및 방법

균주의 분리

아크릴로니트릴을 생산하는 업체인 동서석유화학(주)의 폐수를 100 배 희석하여 0.01g/l 아크릴로니트릴, 0.5g/l glucose, 0.5g/l bacto peptone 인 조성의 배지를 50 ml 포함하고 있는 250 ml flask 에 위 폐수 2.5 ml 를 접종하여 28°C에서 24 시간 동안 배양하였다. 위 배양액을 0.1% (v/v) 아크릴로니트릴, 2.5% (wt/v) glucose, 2% (wt/v) agar 를 포함하고 있는 agar plate 에 직접 streaking 하여 생성된 colony 들로부터 nitrile-hydratase 활성이 있는 균주들을 분리하였다.

효소활성 측정

분리한 균주를 10g/l glucose, 3g/l yeast extract, 3g/l malt extract, 5g/l bacto peptone 을 포함하는 배지에서 24 시간 동안 배양하였다. 배양액 1 ml 원심분리하여 3% (v/v) 아크릴로니트릴 1 ml 를 포함하고 있는 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.0)에 풀어서 균일하게 교반하면서 3 분 동안 4°C에서 반응시켜서 효소의 활성을 측정하였다. 이 반응

을 통해 생성된 아크릴아마이드의 농도는 FID gas chromatography (Gow Mac Model 750P)에 의하여 측정하였다. Detector 와 injection ports 의 온도는 각각 210°C와 180°C로 유지하였고, carrier gas 는 helium 을 사용하였으며 flow rate 는 30 ml/min 이었다.

Nitrile hydratase 의 아크릴아마이드 생성활성 1 unit 는 1 분당 1 μ mol 의 아크릴아마이드를 생성하는 효소의 양으로 정의하였으며, specific activity 의 단위는 units/mg of dry cells 로 표현된다. Cell 성장은 spectrophotometer 에 의해 측정하였으며 610 nm 에서 1 O.D. 는 0.4 mg/ml (dry basis)였다.

아크릴아마이드의 분리

생성된 물질이 아크릴아마이드인지 여부를 확인하기 위하여 반응물을 원심분리하여 cell 을 제거하고 그 여액을 냉동건조 후, 메탄올로 추출하여 infrared (IR) 분석을 위해 상온에서 진공건조시켜서 무색의 결정체를 얻었다.

균체의 고정화 (whole cell immobilization)

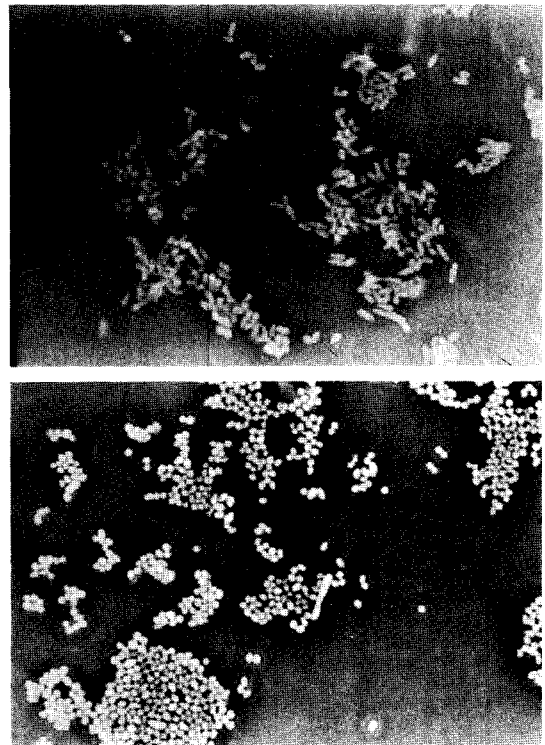


Fig. 1. *Brevibacterium* sp. CH1 when grown at 28°C. (a) after 24 h (b) after 3 days.

Table 1. Characteristics of isolated strain.

(1) Shape and size of cells	irregular rod before 24 h culture, sphere after 3 day culture (Fig. 1). 5-10×0.9μm
(2) Motility	none
(3) Spore	none
(4) Gram staining	positive
(5) Acid fastness	negative
(6) Catalase	positive
(7) Behavior to oxygen	aerobic
(8) Formation of gas from saccharide	<u>Formation of gas</u>
Glucose	-
Maltose	-
Saccharose	-
Lactose	-

단량체 (4.5g 아크릴아마이드)와 가교제 (0.5g NN-methylene bisacrylamide)를 증류수 40 ml에 녹인다. 이 용액에 wet cell 10g을 첨가하여 균일하게 교반시킨다. 위의 용액에 촉매로 5% (v/v) β-dimethylaminopropionitrile 5 ml와 개시제로 2.5% potassium persulfate 10 ml를 넣어 polymerization시킨다. 이상의 반응은 효소의 활성감소를 방지하기 위하여 4°C의 항온조에서 수행하였다. 이상과 같이 만든 gel은 3mm 이하인 입방체로 자른 후 pH7의 phosphate buffer 용액에 넣어 냉장고에 보관하였다.

결과 및 고찰

균주의 동정

Nitrile hydratase 활성을 가진 균주 5종을 분리하였다. 분리한 균주들 중에서 가장 높은 활성을 가진 박테리아를 본 연구에 사용하였다. 활성이 가장 높은 균주의 특성은 Table 1에 나타나 있다.

이 균주는 Bergey's manual of determinative bacteriology (9)에 따라 *Brevibacterium*으로 동정되어 *Brevibacterium* sp. CH1으로 명명되었다. 지금까지 문헌에 보고된 여러가지 균주들의 nitrile hydratase 활성의 비교결과가 Table 2 나타나 있다.

Table 2. Comparison of nitrile hydratase activity of several strains.

Strain	Specific activity (units/mg dry cells)	Reference
<i>Pseudomonas</i>	0.35	(4)
<i>Arthrobacter</i>	1.6	(3)
<i>Corynebacterium</i>	50	(12)
<i>Rhodococcus</i>	4	(5, 6)
<i>Brevibacterium</i> CH1	10	this work

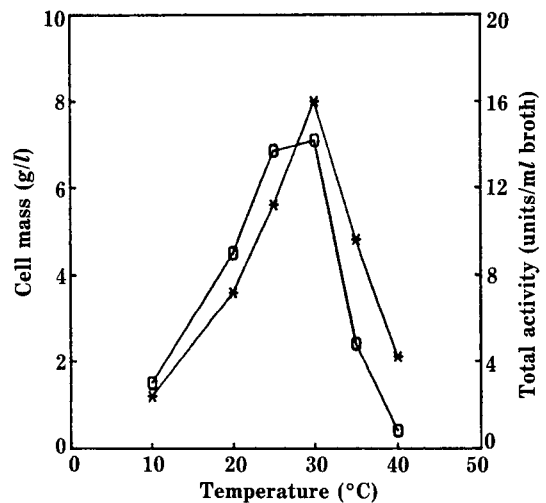


Fig. 2. Effect of temperature on growth and enzyme formation.

*: cell mass, ○: total activity (units/ml broth)

Nitrile hydratase 형성과 성장에 대한 배양온도 효과

Fig.2는 nitrile hydratase의 최대 활성은 균주가 27°C 이하에서 배양했을때 얻어지며, 반면 최대 성장은 30°C에서 얻어짐을 보여주고 있다. 효소의 활성은 배양온도가 27°C 이상에서 감소하였다. 따라서 최적 배양온도는 효소의 활성과 균의 성장을 고려할 때 28°C 주위였다.

배양시간에 따른 nitrile hydratase 형성

Fig.3은 배양시간에 따른 nitrile hydratase의 비활성(specific activity)과 cell 농도의 변화를 보여준다. 효소의 비활성은 late exponential growth phase인 20시간의 배양시간 주위에서 최대였고, 그 이후 stationary phase에서 활성의 감소가 관찰되었다. 따라서 효소의 활성이 높은 균주를 얻기 위해서는 20시간 배양 후 균주를 회수해야 한다.

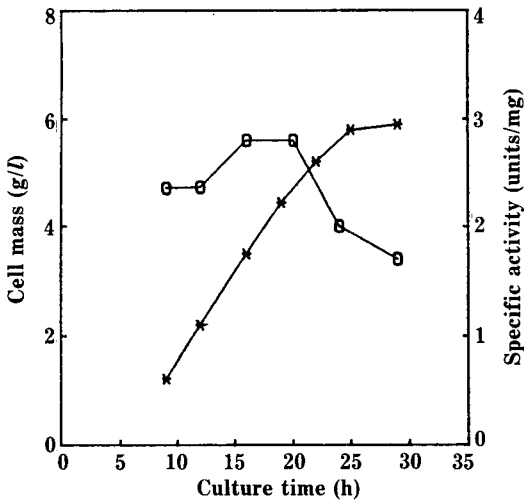


Fig. 3. Formation of nitrile hydratase during cultivation at 28°C.

*: cell mass, o: specific activity

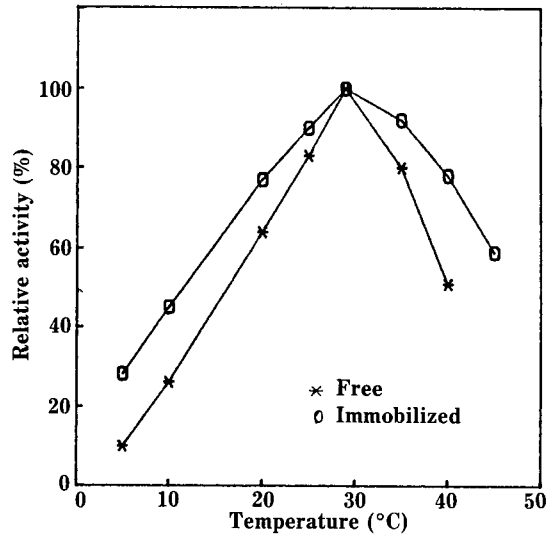


Fig. 5. Effect of temperature on the activity of free and immobilized cells.

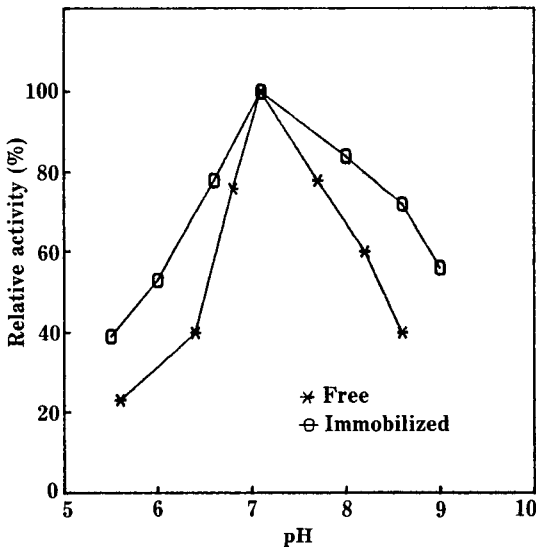


Fig. 4. Effect of pH on the activity of free and immobilized cells.

(pH 5-6: 0.1 M phosphate buffer, pH 8.6: glycine-NaOH buffer)

아크릴아마이드 생산에 대한 pH의 영향

Fig.4는 nitrile hydratase의 pH에 대한 영향을 보여주고 있는데, 고정화 cell이 free cell보다 덜 민감한 것을 알 수 있었다. 이것은 고정화시켰을 때 일반적으로 나타나는 현상으로 물질전달저항, electrostatic, electrokinetic 등 여러 현상들의 복합적인 요인에 의한 것이다. 효소활성의 최적 pH는

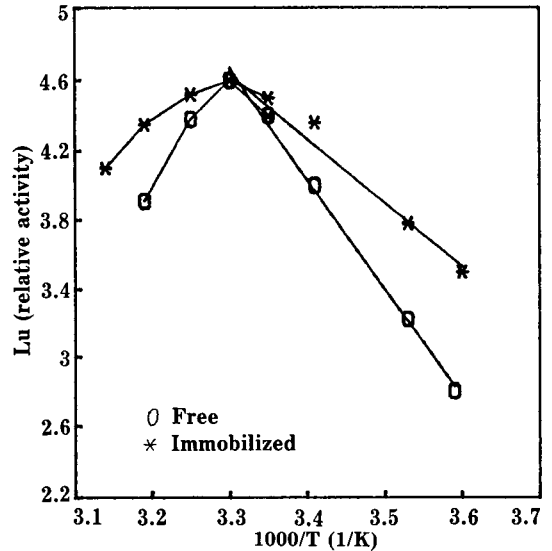


Fig. 6. Arrhenius plot of free and immobilized cells.

둘다 7 주위에서 나타났으며, nitrile hydratase는 비교적 pH 변화에 민감한 효소임을 알 수 있었다.

아크릴아마이드 생산에 대한 온도의 영향

Fig.5는 고정화 cell과 free cell의 온도에 대한 영향을 보여주고 있는데 고정화 cell이 온도에 대해서도 free cell보다 덜 민감한 것을 알 수 있었다. 최적 반응온도는 둘다 25°C였다. 이것도 역시 고정화시켰을 때 나타나는 일반적인 현상이다. Fig.6은 relative activity에 대한 Arrhenius plot으로 free

Table 3. Effects of carbon sources on the formation of nitrile hydratase and cell growth of *Brevibacterium* sp. CH1.

Carbon source (1.5%)	Cell growth (mg cells/ml broth)	Specific activity (units/mg dry cells)	Broth activity (units/ml broth)
D-Glucose	8.74	4.03	35.2
D-Fructose	10.34	3.57	36.9
Dextrin	NT	NT	NT
Maltose	7.80	0.68	5.3
Saccharose	4.04	1.53	6.2
Malt extract	0.47	11.50	5.42

Culture time : 24 h, culture temp. : 28°C,
basic medium : bacto peptone : 0.5%
yeast extract : 0.3%

NT : not tested

Table 4. Effects of concentration of glucose on the formation of nitrile hydratase and cell growth of *Brevibacterium* sp. CH1.

Glucose conc. (%)	Cell growth (mg cells/ml broth)	Specific activity (units/mg dry cells)	Broth activity (units/ml broth)
1	6.9	5.10	35.2
2	7.1	4.96	35.2
3	6.5	5.40	35.2
5	6.9	4.35	30.0

Culture time : 24 h, culture temp. : 28°C,
basic medium : bacto peptone : 0.5%
yeast extract : 0.3%
malt extract : 0.3%

cell에서는 활성화에너지가 14.9 kcal/gmol, 고정화 cell에서는 활성화에너지가 8.96 kcal/gmol로서 이 두 활성화에너지의 비가 1:0.6이 된다. 일반적으로 고정화효소가 강한 물질전달저항을 갖고 있을 때 1:0.5가 되는데(10), 아크릴아마이드 bead에서도 물질전달저항이 비교적 큰 것을 알 수 있었다. 이때의 bead 크기가 3mm 정도의 입방체로 bead를 좀 더 작게 만들 경우 물질전달저항을 충분히 줄일 수 있을 것이다.

성장과 효소생성에 대한 배지의 탄소원 효과

Brevibacterium sp. CH1의 성장과 nitrile hydratase의 생성은 배지의 탄소원(carbon source)에 의해

Table 5. Effects of organic nitrogen sources on the formation of nitrile hydratase and cell growth of *Brevibacterium* sp. CH1.

Nitrogen source (1%)	Cell growth (mg cells/ml broth)	Specific activity (units/mg dry cells)	Broth activity (units/ml broth)
Yeast extract	9.59	0.57	5.42
Bacto peptone	2.82	6.24	17.60
Casamino acid	3.76	2.16	8.13
Complex*	6.90	5.10	35.20

Culture time : 24 h, culture temp. : 28°C,
basic medium : glucose : 1%
*complex : bacto peptone : 0.5%
yeast extract : 0.3%
malt extract : 0.3%

Table 6. Effects of magnesium concentration on the formation of nitrile hydratase and cell growth of *Brevibacterium* sp. CH1.

MgSO ₄ ·7H ₂ O (g/l)	Cell growth (mg cells/ml broth)	Specific activity (units/mg dry cells)	Broth activity (units/ml broth)
0	7.1	4.96	35.2
0.05	6.9	5.10	35.1
0.1	7.0	5.02	35.2
0.2	7.0	5.02	35.2
0.3	7.0	5.02	35.2
0.5	7.0	5.02	35.2

Culture time : 24 h, culture temp. : 28°C,
basic medium : glucose 1.0%
bacto peptone : 0.5%
yeast extract : 0.3%
malt extract : 0.3%

크게 영향을 받는다. 여러가지 탄소원을 넣고 배양한 후 얻어진 결과가 Table 3에 나타나 있다. Glucose와 fructose가 성장과 효소활성을 고려할 때 가장 효과적인 탄소원이었으며, glucose 농도의 변화에 따른 효소생성의 변화는 거의 없었다(Table 4).

성장과 효소생성에 대한 배지의 질소원 효과

Table 5에 나타난 바와 같이 성장과 효소활성을 고려할 때 bacto peptone 5g/l, yeast extract 3g/l, malt extract 3g/l의 조성을 가진 complex nitrogen이 가장 효과적인 질소원이었다.

Table 7. Effects of inorganic compounds on the formation of nitrile hydratase and cell growth of *Brevibacterium* sp. CH1.

Metal ion ($1 \times 10^{-3}M$)	Cell growth (mg cells/ml broth)	Specific activity (units/mg dry cells)	Broth activity (units/ml broth)
None	7.1	4.96	35.2
CoCl ₂	0.2	NT	NT
MnSO ₄	0.2	NT	NT
FeSO ₄	3.7	4.38	16.2
CaCl ₂	7.8	1.11	7.04

Culture time : 24 h, culture temp. : 28°C,
basic medium : glucose : 1.0%

bacto peptone : 0.5%
yeast extract : 0.3%
malt extract : 0.3%

NT: not tested

Table 8. Substrate specificity of nitrile hydratase of *Brevibacterium* sp. CH1.

Nitrile	Specific activity (units/mg dry cells)	Relative activity (%)
Acetonitrile	3.1	31
Propionitrile	11.0	110
Nicotinonitrile	11.3	113
Acrylonitrile	10.0	100

성장과 효소생성에 대한 금속이온 효과

Mg 이온이 nitrile hydratase 생성에 상당한 영향을 주는 것으로 보고되어 있으나(11), 본 실험의 결과(Table 6) Mg 이온의 효과가 없었다. 이는 complex medium 자체에 효소생성에 필요한 정도의 Mg 이온을 포함하고 있기 때문인 것으로 생각된다.

또한 Fe 이온을 소량 첨가시 nitrile hydratase의 생성이 50 배 정도 증가하였다는 보고가 있으나(12), 본 실험결과에서는 Fe, Mn, Co, Ca 와 같은 금속이온의 첨가시 성장을 저해할 뿐 효소생성을 증가시키는 효과가 없었다(Table 7).

반응물 특이성

아크릴로니트릴 이외의 CN 기를 갖는 물질에 대한 이 균주의 반응성을 알아보기 위하여 몇 종류의 nitrile에 대하여 실험을 하였다. 그 결과 *Brevibacterium* sp. CH1은 acetonitrile, propionitrile 등의 지방족 니트릴 뿐만 아니라, nicotinonitrile과 같은 방

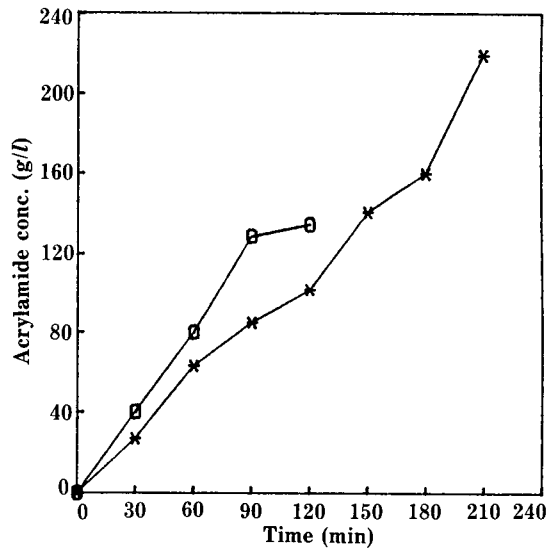


Fig. 7. Time course of acrylamide production at 4°C.
□: initial substrate concentration (5%), 1 ml acrylonitrile addition per 30 min
*: initial substrate concentration (3.7%), 0.5 ml acrylonitrile addition per 30 min

향족 니트릴에도 활성이 있었다(Table 8).

Free cell에 의한 아크릴아마이드 생산

Brevibacterium sp. CH1의 free cell에 의하여 아크릴로니트릴을 수화시켜 아크릴아마이드를 생산하였다. 균을 배양해서 얻어지는 배양액을 원심분리하여 얻은 균을 효소원으로 사용하여 4°C에서 효소와 반응물을 혼합시키면서 반응시켰다. 순수한 아크릴로니트릴을 30분마다 반응기에 첨가하면서 반응시킨 결과 Fig.7에 나타나 있다. 초기의 반응물 농도가 5% (v/v)에서 시작하여 30분마다 순수한 반응물 1 ml씩 첨가했을 경우 2시간 후에 아크릴아마이드의 농도가 135 g/l에 이른 후 반응이 더 이상 진행되지 않았다. 3.7% (v/v)에서 시작하여 30분마다 0.5 ml씩 첨가했을 경우 210분 후에 아크릴아마이드의 농도가 220 g/l에 도달하였다.

이 실험의 초기반응물의 농도가 낮고 첨가하는 반응물의 양이 적을수록 기질저해를 덜받고 안정성도 좋아 최종 생산물의 농도가 증가하였다.

결론

Nitrile hydratase 활성을 갖고 있는 균주를 발견하여 동정하였다. 이 균주는 *Brevibacterium* sp. CH1으로 명명되었다. 또한 free cell에 의한 아크릴아마

이드 생산을 위한 최적 배양 및 반응조건을 실험하였다. 최적 배양온도는 효소의 활성과 성장을 고려할 때 28°C였고, 최적 반응온도 및 pH는 각각 25°C, pH 7.0 이었다. 배지의 최적화 실험결과 탄소원으로 glucose 10 g/l, 질소원으로 bacto peptone 5g/l, malt extract 3g/l, yeast extract 3g/l를 사용했을 때가 효소활성과 성장을 고려할 때 가장 효과적이었다. 이 균주는 acetonitrile, propionitrile 등의 aliphatic nitrile과 ricotinonitrile 같은 aromatic nitrile에 대해서도 작용하여 그에 대응하는 아마이드의 생산에 이용할 수 있음을 확인하였다.

참고문헌

1. Digeronimo, M.J. and A.D. Antoine: *Appl. and Environ. Microbiol.*, **31**, 900 (1976).
2. Arnaud, A., P. Galzy and J.C. Jallageas: *Comptes rendus de l'Academie des Science de Paris*, **287**, 571 (1976).
3. Asano, Y., K. Fujishiro, Y. Tani and H. Yamada: *Agric. Biol. Chem.* **46**, 1165 (1982).
4. Asano, Y., T. Yasuda, Y. Tani and H. Yamada: *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 1183 (1982).
5. Mauger, J., T. Nagasawa and H. Yamada: *J. of Biotechnol.*, **8**, 87 (1988).
6. Nagasawa, T., C.D., Mathew, J. Mauger and H. Yamada: *Appl. and Environ. Microbiol.*, **54**, 1766 (1988).
7. Bui, K., M. Maestracci, A. Thiery, A. Arnaud and P. Galzy: *J. Appli. Bacteriol.*, **57**, 183 (1984).
8. Fradet, H., A. Arnaud, G. Rios and P. Galzy: *Biotechnol. Bioeng.*, **27**, 1581 (1985).
9. Buchanan, R.E. and N.E. Gibbons, *Bergey's Manual of determinative bacteriology* 8th Ed., The Williams and Wilkin's Co., Baltimore, (1974).
10. Froment, G.F. and K.B. Bischoff: "Reaction with pore diffusion", *Chemical Reactor Analysis and Design*, John Wiley and Sons, N.Y., 178-229 (1979).
11. Yamaguchi, Y., I. Watanabe and Y. Satoh, UK patent application 2,054,563 (1980).
12. Yamada, H., K. Ryuno, T. Nagasawa, K. Enomoto and I. Watanabe: *Agric. Biol. Chem.* **50**(11), 2859 (1986).

(Received July 19, 1989)