

여러가지 조건하에서 *Brevibacterium* sp. CH1의 Nitrile Hydratase의 안정성

황준식¹ · 장호남^{2*}

¹국방과학연구소, ²한국과학기술원 화학공학과

A Study on Stability of Nitrile Hydratase of *Brevibacterium* sp. CH1 Under the Various Conditions

Hwang, Jun-Sik and Ho-Nam Chang*

Explosive Train and Pyrotechnic Division, ADD, P.O. Box 35, Teajeon, Korea

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

A bacterial strain of *Brevibacterium* sp. CH1 was isolated from soil and used to produce an enzyme (nitrile hydratase) necessary for carrying out the bioconversion of acrylonitrile to acrylamide. Various immobilization methods and enzyme stability were investigated. The nitrile hydratase showed the maximum stability at pH 7 for the free cells. EDTA and phenyl methyl sulfonyl fluoride were selected as the protease inhibitor and the enzyme stability was evaluated by changing inhibitor concentration. Acrylamide beads were the best carriers among four carriers we tested in terms of stability and physicochemical strength. The storage stability of the immobilized cells decreased with increasing acrylamide concentration of the gel phase at 4°C, and was very low at acrylamide concentration above 25%.

아크릴아마이드는 합성섬유, 오일회수, 응집제, 종이제조, 적물의 와니스, 토목공사 등에 다양하게 사용되고 있다.

아크릴아마이드 생산의 기존방법은 황산이나 구리 촉매를 사용하여 아크릴로니트릴을 수산화시켜 제조한다. 니트릴을 화학적으로 수산화시키는데는 아마이드, 카르복실산과 암모니아로 진행되는 연속반응을 조절하기가 어렵다. 황산촉매를 사용하는 공정은 부산물로 암모니움 황화물을 생산하여 심한 환경오염을 초래하는 것으로 알려져 있다. 최근에 산이나 염기없이 니트릴을 선택적으로 수산화하여 아마이드를 생산할 수 있는 구리염 혹은 팔라듐 복합체 촉매가 개발되었다(1, 2). 그러나 이 촉매들의 제조가 어렵고 전환율은 95%인 것으로 보고되었다.

Nitto 화학(주)은 3종류의 미생물(*Nocardia*, *Microbacterium*, *Corynebacterium*)을 사용하여 아크릴로니트릴을 아크릴아마이드로 수산화시키는 생물공학적 방법을 보고하였다(3, 4, 5).

Hwang and Chang(6)은 이중실관 생물반응기에서 *Brevibacterium* sp. CH1을 배양하여, 아크릴아마이드를 14일 이상 동안 연속적으로 생산하였다. 소규모로 조업시는 이중실관 생물반응기가 효과적이거나 현재로는 대량생산시 여러가지 문제점이 있다. 그래서 큰 어려움이 없이 대량생산이 가능한 충전탑 반응기에 아크릴아마이드로 고정화한 미생물을 충전한 후 아크릴아마이드의 고농도 생산을 시도하였다(7).

효소가 아크릴아마이드의 생산과 같은 실제적인 공정에 응용할 때 안정성은 매우 중요한 요소가 된다. 효소들은 미생물의 배양 중에는 안정할지라도, 높은 반응물 및 생산물농도, 고온, 이물질의 존재, pH 등과 같은 상태에서 불안정하다.

Key words: *Brevibacterium* sp. CH1, immobilization, stability, nitrile hydratase, acrylonitrile, acrylamide

*Corresponding author

전세포 효소는 정제하지 않으므로 해서, protease 가 그 효소의 바람직하지 않은 상태에서 활성화되어 우리가 원하는 효소를 분해시킨다. 안정한 효소를 얻는 가장 좋은 수단은 균주의 분리와 배양조건을 조절하는 것이다. 배양 후에 효소의 불안정성을 수정하는 것은 어렵다. 어느 효소를 안정화하는데 유용한 첨가물은 금속, protease inhibitor, pH, 단백질, 원하는 효소의 반응물 혹은 생산물, 고정화 등이다(8).

이 논문은 효소 수화공정에 사용되는 여러가지 상황에서 전세포 효소인 nitrile hydratase 의 안정성에 영향을 주는 요소들에 대비하여 알아보았다.

재료 및 방법

균주의 분리

아크릴로니트릴을 생산하는 업체인 동서석유화학(주)의 폐수를 100 배 희석하여, 0.01 g/l 아크릴로니트릴, 0.5 g/l glucose, 0.5 g/l bacto peptone 인 조성의 배지를 50 ml 포함하고 있는 250 ml flask 에 위 폐수를 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.

배지 및 배양조건

배지의 조성은 glucose 10 g/l, bacto peptone 5 g/l, yeast extract 3 g/l, malt extract 3 g/l, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , NaCl 1 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/l 이다. 배양은 24 시간 동안 28°C에서 flask 배양 후, 이 배양액 5% 를 동일배지의 1.5 l 발효조 (Rikakikai, M100)에 접종하여 24 시간 동안 주 배양후 cell 을 회수하여 효소원으로 사용하였다.

효소활성 측정

배양액 1 ml 를 원심분리하여 3% (v/v) 아크릴로니트릴 1 ml 를 첨가하여 균일하게 교반하면서 3 분 동안 4°C에서 반응시켜서 효소의 활성을 측정하였다. 이 반응을 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 μmol 의 아크릴아마이드를 생성하는 반응속도로 정의하였다. Cell 성장은 spectrophotometer 에 의해 측정하였으며 610 nm 에서 1 O.D. 는 0.4 mg/ml (dry basis) 였다.

세포 고정화

셀룰로스 아세테이트 : 셀룰로스 아세테이트 (5g) 를 아세톤 (30 ml) 과 dimethylsulfoxide (20 ml) 의 혼합물에 용해시킨다. Cell 10g (wet weight) 을 위 용액에 넣고 균일하게 혼화되도록 빠르게 교반시킨다. Cell 이 균일하게 분산되면 이 용액을 다공성의 입자를 형성하도록 0.1 M phosphate buffer (pH 7.1) 에 주사기를 사용하여 방울방울 떨어뜨린다. 위와 같이 형성된 다공성의 bead 는 buffer 용액을 갈아주면서 계속 교반하여준다. 이렇게 얻어진 bead 는 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) 용액에 담귀 4°C 냉장고에 보관한다.

Calcium (Barium) alginate : 1.6g 을 용해시킨 70 ml 의 sodium alginate 용액과 균일하게 혼화되도록 교반하여준다. 위 용액이 bead 를 형성하도록 0.1 M CaCl_2 (BaCl_2) 에 주사기를 사용하여 방울방울 떨어뜨린다.

아크릴아마이드 : 단량체 (4.5g 아크릴아마이드) 와 가교제 (0.5g NN-methylene-bisacrylamide) 를 증류수 40 ml 에 녹인다. 이 용액에 wet cell 10g 을 첨가하여 균일하게 교반시킨다. 위의 용액에 촉매로 5% (v/v) β -dimethylaminopropionitrile 5 ml 와 개시제로 2.5% potassium persulfate 10 ml 를 넣어 polymerization 시킨다. 이상의 반응은 효소의 활성감소를 방지하기 위하여 4°C의 항온조에서 수행하였다. 이상과 같이 만든 gel 은 3mm 이하인 입방체로 자른 후 pH 7 의 phosphate buffer 용액에 넣고 냉장고에 보관하였다.

결과 및 고찰

Free cell 의 저장안정성

Fig.1 은 온도 25°C에서 pH 에 대한 안정성을 보여준다. pH 7 에서 안정성이 가장 좋아 반감기가 35 시간이었다. 또한 산성 (pH 6.0) 에서 보다 알칼리성 (pH 8.0) 에서 더 안정성이 좋음을 보여주고 있다.

Stationary phase 에서 성장환경이 나빠서 protease 가 활성화되는 것을 protease inhibitor 를 첨가하여 inhibition 시키므로서 nitrile hydratase 의 저장안정성을 높일 수 있는지를 확인하기 위하여 2 종류의 protease inhibitor 인 EDTA 와 phenyl methyl sul-

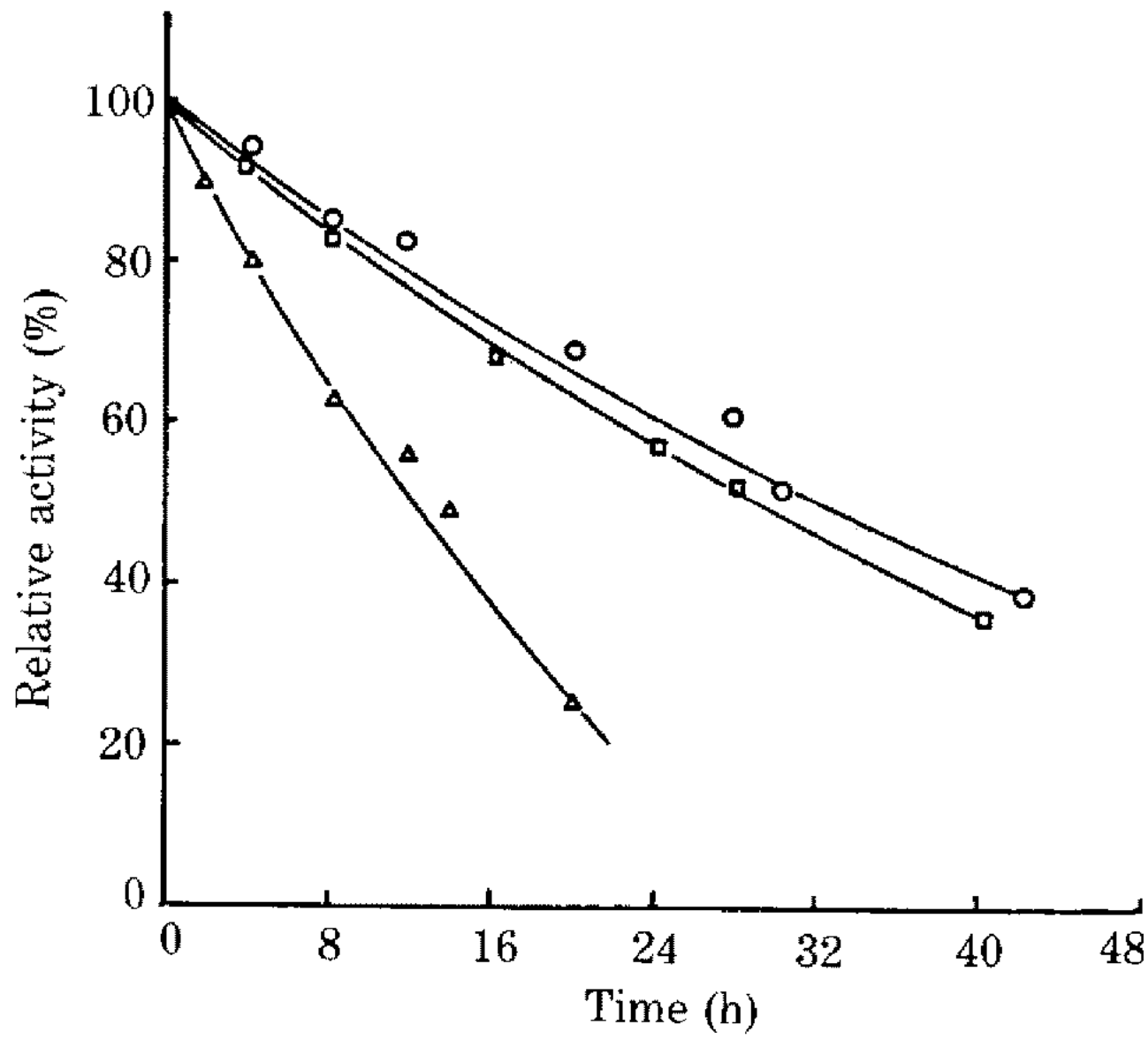


Fig. 1. Storage stability vs pH for free cell at 25°C.
○: pH 7.0, □: pH 8.0, △: pH 6.0

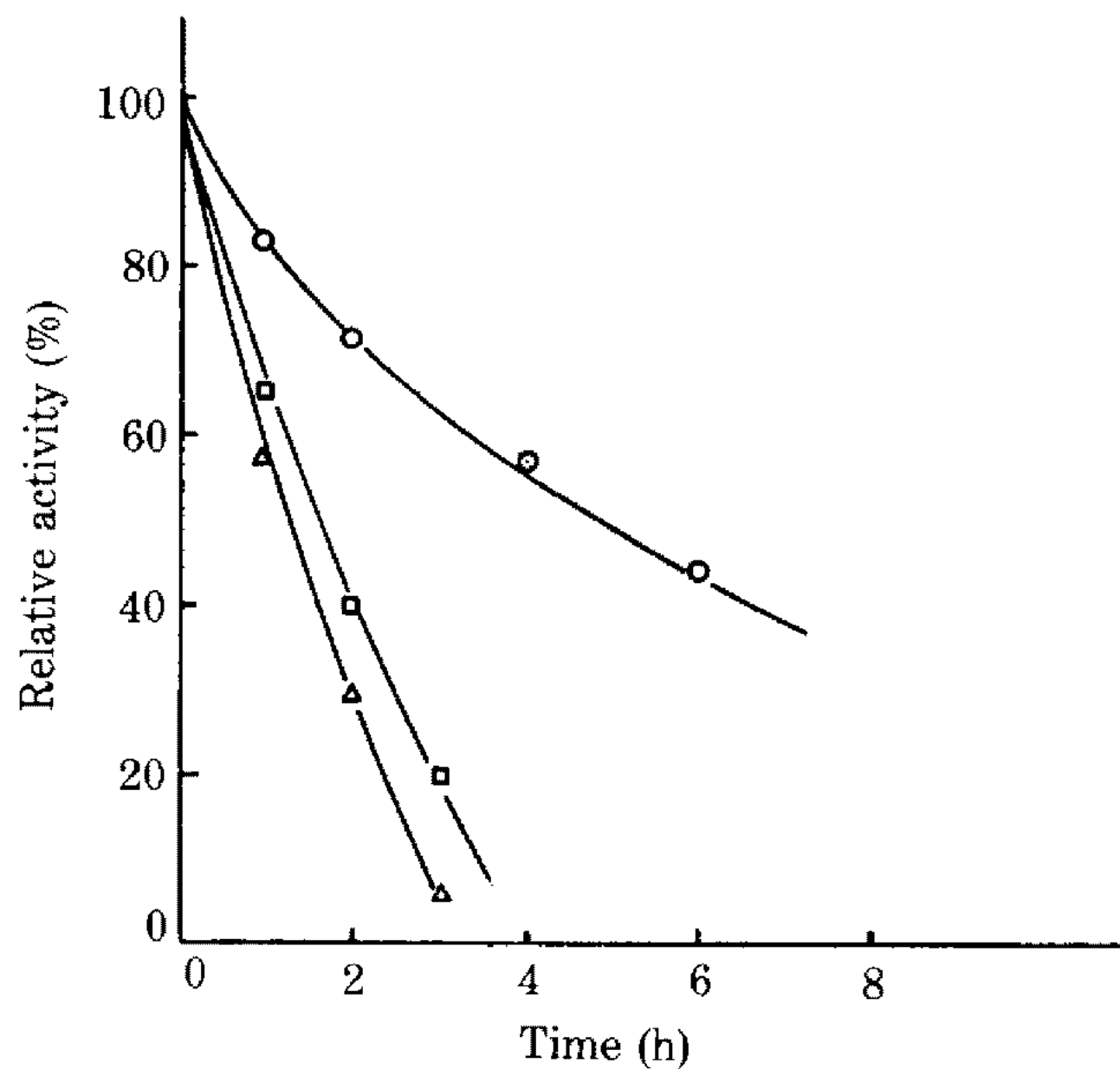


Fig. 2. Storage stability vs EDTA concentration for free cell at 35°C.
○: 0 mmol/l, □: 1 mmol/l, △: 2 mmol/l

fonyl fluoride 를 첨가하여 35°C에서 저장 안정성 시험을 실시하였다(9).

Fig.2은 ethylene-diaminetetraacetic acid(EDTA) 0, 1, 2 mmol/l 을 넣고 35°C에서 시험한 결과인데 예상외로 protease inhibitor 인 EDTA 를 많이 넣을수록 안정성이 떨어졌다. 이는 nitrile hydratase 의 co-factor 인 Mg 이온을 EDTA 가 잡아먹기 때문인 것으로 생각된다(4).

Fig.3은 protease inhibitor로서 phenyl methyl

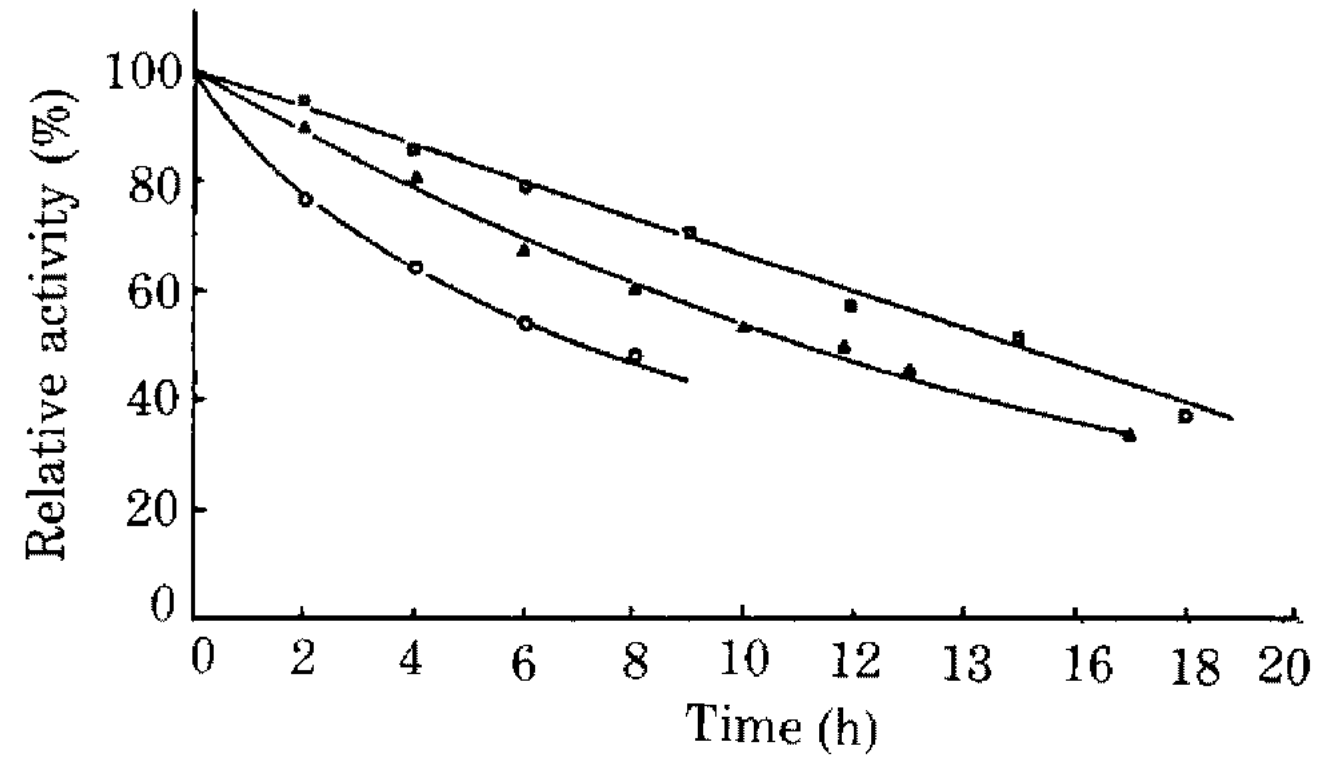


Fig. 3. Storage stability vs phenyl methyl sulfonyl fluoride concentration for free cell at 35°C.
□: 10 mmol/l, △: 5 mmol/l, ○: 0 mmol/l

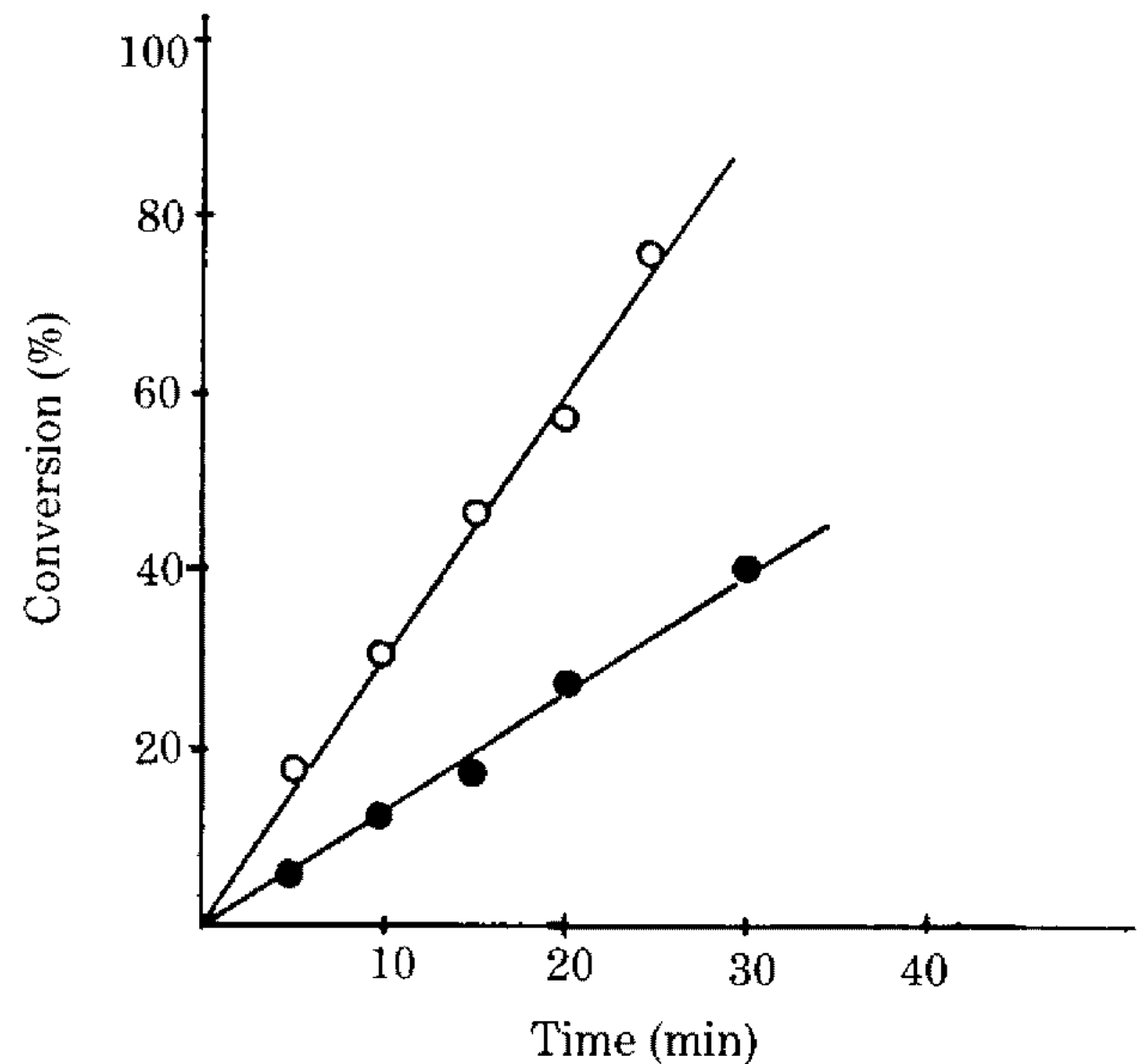


Fig. 4. Plot for determining activity recovery of cell immobilized by acrylamide.
○: free cell, ●: immobilized cell

fluoride 를 첨가하여 35°C에서 안정성 시험을 한 결과인데 위 inhibitor 를 많이 첨가할수록 안정성이 증가하는 것을 보여주고 있다. 이는 cell 이 stationary phase 에 들어가면 nitrile hydratase 효소활성이 급격히 감소하는 원인이 성장환경이 나쁜 stationary phase 에서 protease 활성이 커져 nitrile hydratase 효소를 분해시켜 버리기 때문이다(9). Cell 의 저장시 protease inhibitor 를 소량 첨가하여 효소의 저장안정성을 높일 수 있다.

고정화 세포의 활성회수율

Fig.4는 3%, 25ml 아크릴로니트릴 용액에 0.5g free cell 을 넣고, 다른 flask 에는 고정화시켰을때 이에 대응하는 양의 bead(wet weight : 3.5g)를 넣고

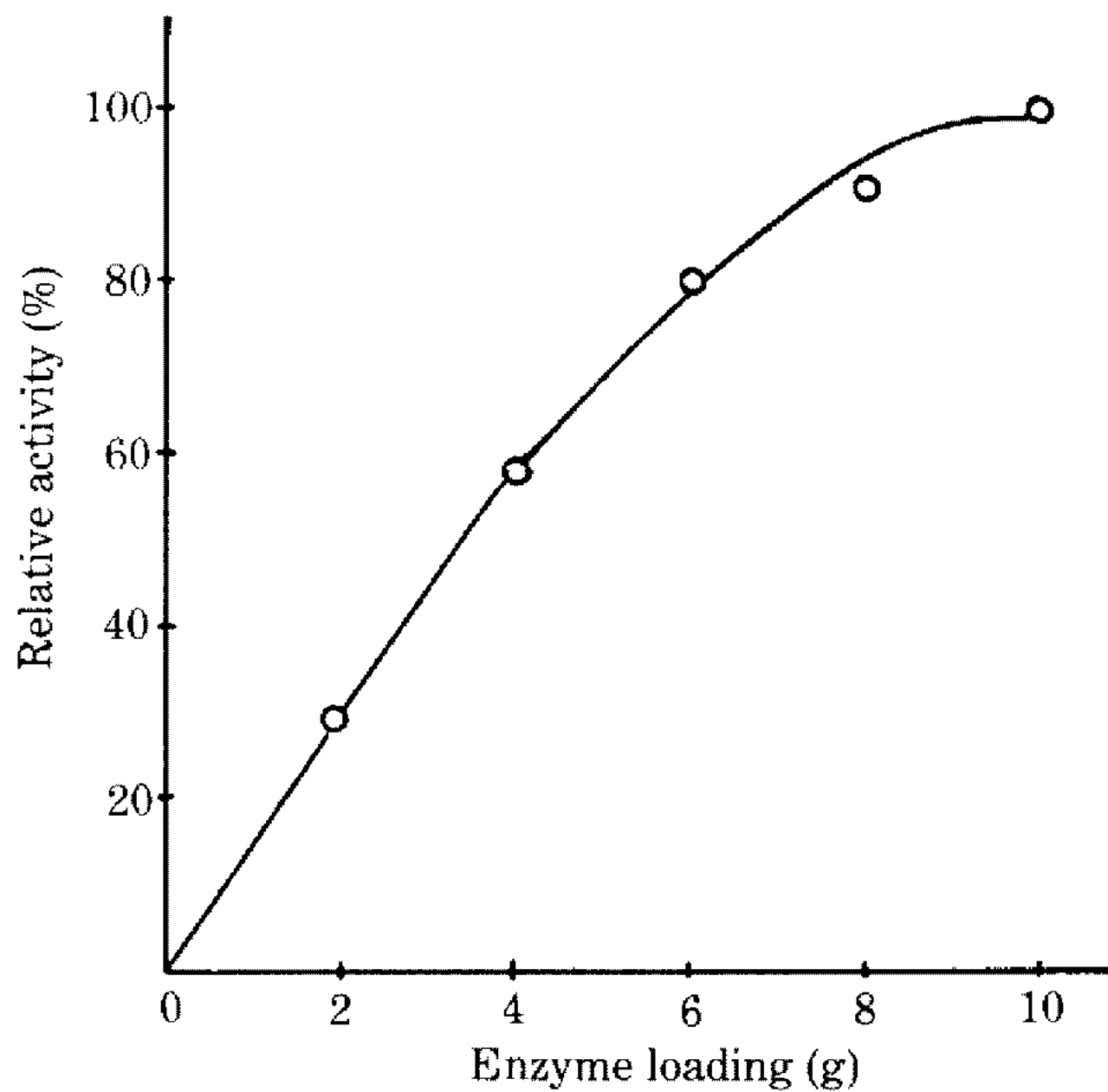


Fig. 5. Effect of enzyme loading on immobilized cell, enzyme loading is g cell in (40 ml water + 4.5g acrylamide + 0.5g NN-methylenebisacrylamide + 5 ml β -dimethylaminopropionitrile + 10 ml potassium persulfate).

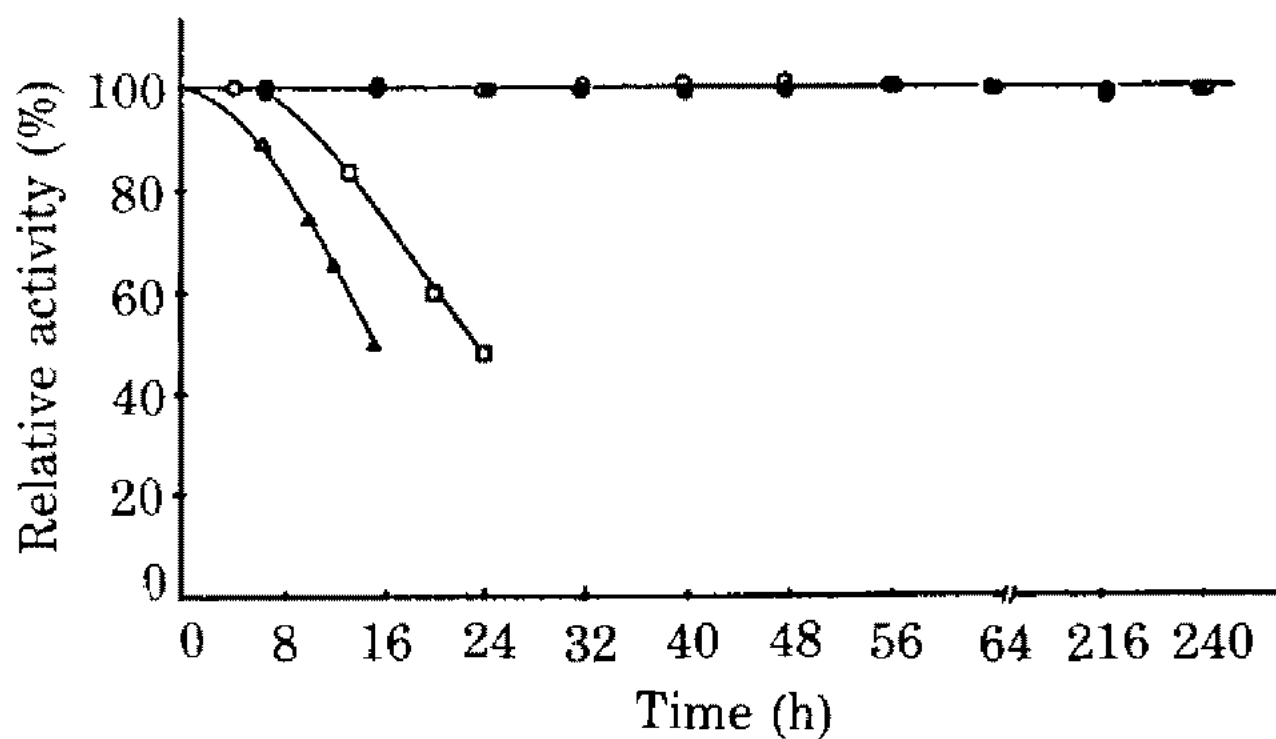


Fig. 6. Effect of carriers on operational stability of nitrile hydratase.

○: acrylamide, ●: barium alginate, □: calcium alginate, △: cellulose acetate

shaker에서 200 rpm으로 반응을 시켰을 때의 결과이다. 이 때 free cell의 경우는 reactant volume이 급격히 줄어드는 것을 막기 위하여 1 ml의 sample을 취하였으며 고정화 cell에서는 2 ml의 sample을 취하였다. 이 때 기울기의 비가 활성회수율이 되는데 약 40%의 활성회수율을 얻었다. 일반적으로 고정화했을 때 활성의 감소는 고정화 도중의 감소와 고정화 후 carrier 자체가 갖는 물질전달저항이 원인이 되는데 아크릴아마이드에 의한 고정화는 후자의 영향이 크게 나타났다. 이는 가교제에 의하여 담체가 망상의 구조를 갖기 때문이다.

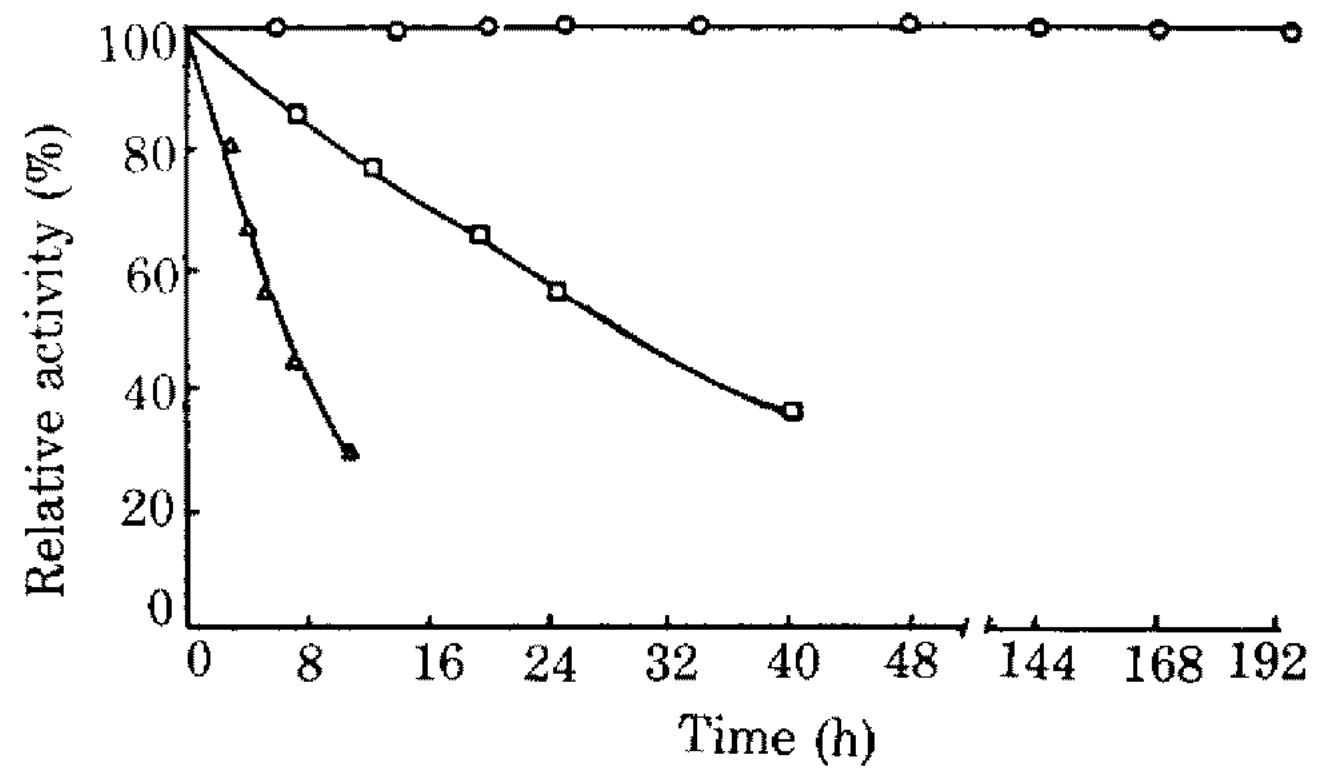


Fig. 7. Effect of temperature on operational stability of nitrile hydratase; carrier (acrylamide).

○: 7°C, □: 26°C, △: 35°C

Cell 부하에 따른 상대적인 활성

Fig.5는 cell 부하에 따른 활성의 변화를 보여주는 것으로써 가로축은 증류수 (40 ml) + 아크릴아마이드 (4.5g) + NN-methylene bisacrylamide (0.5g) + β -dimethylaminopropionitrile (5 ml) + potassium persulfate (10 ml)에 부하된 wet cell의 무게를 나타낸다. Cell 부하 10g 가까이에는 완만한 곡선을 그리는데, 실제로 cell 부하가 많아지면 침전되는 cell이 많아서 효율적이지 못했다. 따라서 10g 정도의 cell 부하가 적합하였으며, cell 부하량이 작으면 반응이 너무 느렸고, 10g 이상일 때는 cell 손실이 많아 모든 실험을 cell 부하량 10g인 상태에서 하였다.

고정화 cell의 조업 및 저장안정성

Carrier에 따른 고정화 cell의 조업안정성 (operational stability)이 Fig.6에 보여준다. Barium-alginate와 아크릴아마이드에 의하여 고정화된 cells는 활성의 감소없이 7일 동안 7°C에서 조업할 수 있었다. Calcium alginate로 고정화한 cells(buffer 사용없음)의 반감기는 7°C에서 24시간이었으며, cellulose acetate로 고정화한 cells의 반감기는 7°C에서 16시간이었다. Barium-alginate와 아크릴아마이드가 안정성이 좋은 carriers였다. 그러나 barium-alginate bead는 장시간 조업시, bead의 바륨이온이 phosphate buffer의 칼륨이온으로 치환되어 조금씩 풀어져 cells이 누출되었다. 그러므로 시험한 4종류의 carriers 중에 아크릴아마이드가 안정성, 물리적 및 화학적 강도면에서 가장 좋은 carrier였다.

Fig.7은 연속조업시에 온도의 안정성을 알아보기 위하여 4, 26 및 35°C에서 아크릴아마이드에 의하여 고정화된 cells의 조업안정성 실험을 한 결과이다. 4°C에서

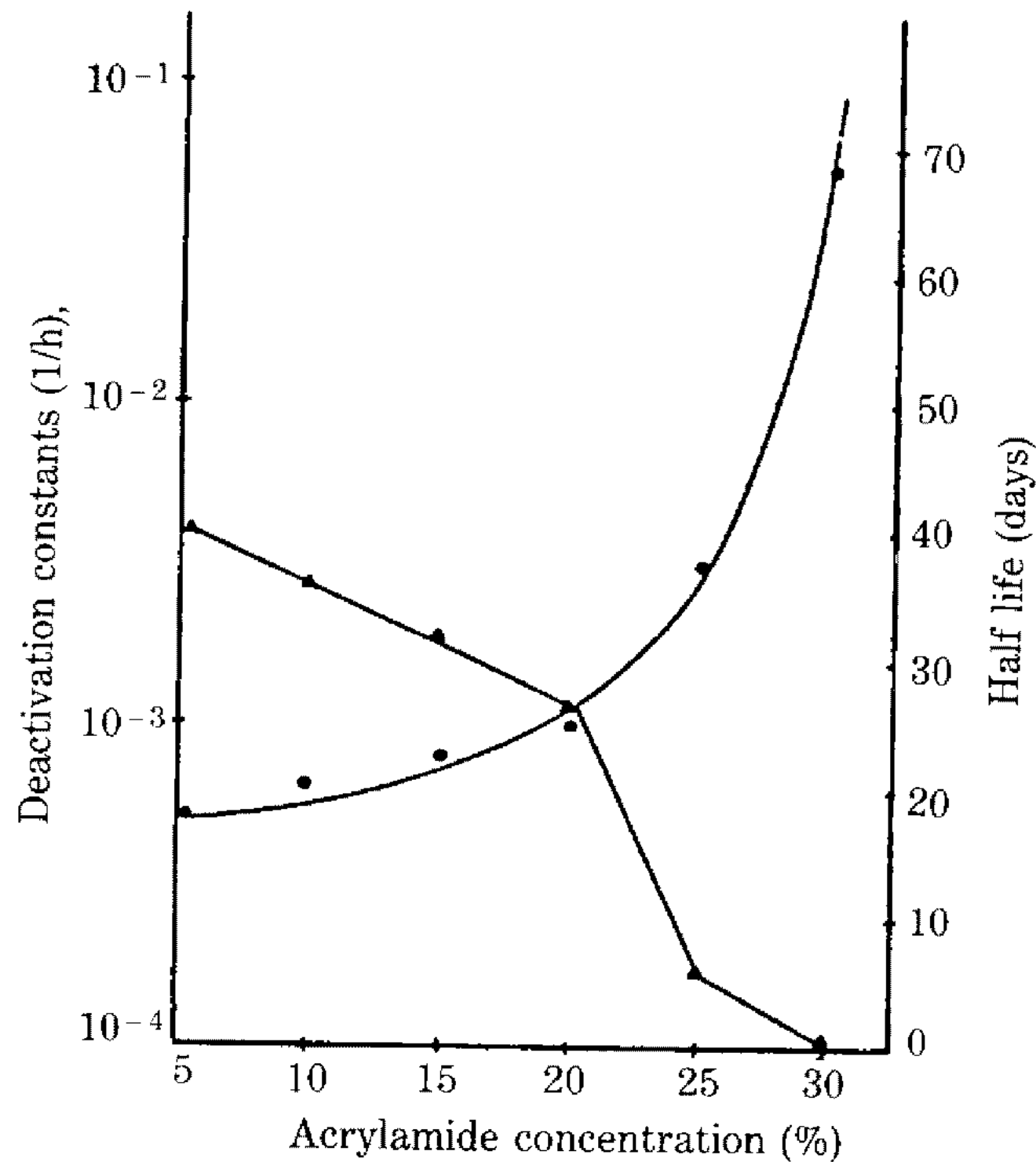


Fig. 8. Enzyme deactivation by acrylamide under no reaction.

$k/k_0 = \exp(-\alpha t)$ ● : deactivation constant ▲ : half life

조업시는 10 일 동안 효소활성의 감소가 거의 없었다. 26°C와 36°C에서 반감기는 각각 20 시간, 7 시간이었다. 그런고로 낮은 온도(4°C 주위)로 조업하는 것이 단위 bead 당 생산량을 고려할 때 유리하다.

Fig.8은 고정화된 cells의 저장안정성이 gel phase의 아크릴아마이드 농도에 따라서 변하고 있음을 보여주고 있다. 효소의 활성감소율(deactivation rate)은 25% 이상의 아크릴아마이드 농도에서 빨리 일어나는 것이 관찰되었다. 저장온도 4°C, 20% 아크릴아마이드 농도에서 반감기가 28일이었다. 위의 데이터는 실제 조업시는 cell(효소) 생산비용과 생산물(아크릴아마이드)의 정제비용을 고려하여 최종 생산물을 어느 정도로 뽑을 것인지를 결정하는데 필요한 중요한 데이터이다.

요 약

Brevibacterium sp. CH1 균주가 흙으로부터 분리하여 아크릴로니트릴을 아크릴아마이드로 생변화를 수행하는데 필요한 효소를 생산하기 위하여 사용하였다. 여러가지 고정화 방법과 효소 안정성이 조사되었다. Nitrile hydratase는 free cell에 대하여 pH7에서 최대 안정성을 보여주었다. EDTA와 phenyl methyl fluoride를 protease inhibitor로 선정하여 inhibitor 농도를 변화시키면서 효소의 저장안정성을 평가하였다.

아크릴아마이드가 안정성 및 물리화학적 강도를 고려할 때 가장 좋은 carrier였다. 고정화 세포의 저장안정성은 4°C에서 gel상의 아크릴아마이드 농도가 증가함에 따라 감소하였고, 25% 이상의 아크릴아마이드 농도에서 안정성이 매우 낮았다.

참고문헌

- Villain, G., G. Constant and A. Gaset: *J. Mol. Catal.*, **7**, 355 (1980).
- Villain, G., P. Kalck and A. Gaset: *Tetrahedron Lett.*, **21**, 2901 (1980).
- Yamaguchi, Y., I. Watanabe and Y. Satoh: U.S. Pat. 4,343,900 (1982).
- Yamaguchi, Y., I. Watanabe and Y. Satoh: U.S. Pat. 4,414,331 (1983).
- Yamaguchi, Y., I. Watanabe and Y. Satoh: U.S. Pat. 4,421,855 (1983).
- Hwang, J.S. and H.N. Chang: *Biotechnol. Lett.*, **9**, 237 (1987).
- Hwang, J.S. and H.N. Chang: *Biotechnol. Bioeng.*, **34**, 380 (1989).
- Reese, E.T. and M. Mandels: *Biotechnol. Bioeng.*, **22**, 323 (1980).
- Hwang, J.S.: Ph. D. Thesis, KAIST (1988).

(Received October 13, 1989)