

Polyurethane Foam 을 이용한 리파아제 생산 균주 *Rhizopus chinensis*의 고정화

주 지 선·류 희 옥·장 용 근
한국과학기술원 화학공학과 및 생물공정 연구센터

Immobilization of *Rhizopus chinensis* using Polyurethane Foams

Ji Sun Joo, Hee Wook Ryu and Yong Keun Chang

Department of Chemical Engineering and Bioprocess Engineering Research
Center, Korea Advance Institute of Science and Tehnology, Taejon, Korea.

ABSTRACT

A simple and effective method has been developed for the immobilization of lipase producing *Rhizopus chinensis* on polyurethane foam. In this method, the fungal cells with 1, 3 specific lipase in their inside are immobilized within the foam matrix. Four types of commercially available polyurethane foam were tested. The ultimate purpose of the process is to produce low-cost biocatalysts for lipase-catalyzed reactions which are being increasingly used for industrial applications.

Effects of several parameters were studied on the cell loading and the hydrolytic activity of intracellular lipase after acetone drying. These parameters were the type, size, and amount of polyurethane foam. In all the cases, the intracellular lipase activity obtained with the foam was approximately twice greater than that obtained in the absence of the foam.

서 론

리파아제(triacylglycerol acylhydrolase : E. C. 3. 1. 1. 3)는 불균일계에서 수용액 에멀전에 존재하는 글리세라이드를 가수분해하는 효소로써 전통적으로 소화제, 세제, 식품공업 또는 유지공업에서의 지방산의 생산 등에 이용되어 왔으며 (1), 새로운 적용분야로서 종이제조공업에서의 펄프 전처리, 에스테르 합성에 의한 optically pure compound의 제조, green chemical의 제조, racemic ester의 stereo-specific hydrolysis, 유지나 지방의 에스테르 교환반응 등을 들 수 있다(2-3).

대부분의 리파아제 생산공정은 회분식 공정으로서 extracellular microbial 리파아제를 발효를 통해 생

성시키는 방법에 의존하고 있으므로, 복잡한 분리, 정제과정이 필요하며, 정제된 리파아제를 산업적으로 활용하려면 고정화의 단계가 거의 필수적으로 뒤따르게 된다.

정제 리파아제의 고정화에 대한 연구로는 packed-bed reactor에서 alumina와 kieselguhr에의 고정화, 그리고 polyvinylchloride, chitin, sepharose에의 coupling 등이 있었다(4, 5). 그러나, 고정화 단계가 복잡하고, 미소 크기의 기공을 가진 담체내에서의 물질전달 제한으로 인해 고정화시 원래의 효소보다 매우 작은 활성을 나타낸다는 문제점이 있고 (5), 무엇보다도 정제된 리파아제의 가격이 비싸기 때문에 상업적으로 적용하기에 어려움이 있다.

고정화 공정에서 dead cell을 이용하는 경우는 고

정화의 목적이 세포내부에 있는 효소만을 이용하기 위한 것이다. 이러한 공정의 장점은 세포로부터 효소를 분리·정제할 필요가 없고, 생축매로부터 생성물을 쉽게 분리할 수 있으며, 효소반응 중의 열안정성 및 조업 안정성이 뛰어나며, cofactor나 조효소 등이 같이 존재하기 때문에 이에 대한 비용이 절감될 수 있다는 점이다(6-9).

고정화 매체로는 생물 고분자, 무기물, 합성고분자 등의 여러물질이 사용되고 있으며, 이중 하나인 polyurethane은 화학적, 기계적으로 안정하며, 값이 싸다는 이점이 있고, 큰 부피로 제조한 다음 원하는 크기로 쉽게 만들 수 있기 때문에 대량생산에도 적합하다(10).

Polyurethane은 prepolymer를 이용한 entrapment 또는 foam을 이용한 흡착방법을 통해 세포의 고정화에 쓰여왔다. Polyurethane은 Methanogen의 배양, 식물세포의 배양, *Arthrobacter*에 의한 NADH의 생산, *Rhizopus arrhizus*의 polyurethane foam에 의한 fumaric acid의 생산 등이 있다(11-13).

본 연구에서는 리파아제를 생산하는 균주의 일종인 *Rhizopus chinensis*를 polyurethane foam에 성장과 동시에 고정화시키는 방법에 대한 것으로서 extracellular 리파아제의 경우와는 달리 정제 및 고정화의 과정없이 간단히 고정화 생축매를 제조하는 것이 궁극적인 목적이다. 이를 위해 시중에서 흔히 구할 수 있는 여러종류의 polyurethane foam을 고정화 담체로 사용하였으며, 여러 배양조건이 고정화 효율 및 효소의 활성에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지

본 실험에서는 ATCC 에서 분양받은 *Rhizopus chinensis*(IFO 4768 with 1, 3 specific lipase)를 사용하였다. 사용된 배지의 조성은 pepton 70g/L, NaNO₃ 1.0g/L, KH₂PO₄ 1.0g/L, MgSO₄ · 7H₂O 0.5g/L이다. 성장에 필요한 탄소원 공급을 위하여 배지 1L당 20g의 oleic acid를 사용하였다.

고정화 매체

본 연구에 사용된 polyurethane foam은 모두 4종류로 중립화학(주)로부터 공급받았으며, 적당한 크기의 입방체로 잘라 사용하였다. 사용된 polyurethane foam의 특성을 Table 1에 나타내었다.

Table 1. Characteristics of polyurethane foams

	Apparent porosity (-)	Apparent pore size (ppi) ^a	Elongation percentage (%)	Tensile strength (kg/cm ²)	Density (kg/cm ³)
GP-330	0.97	33	156	1.3	30.6
HR-320	0.97	38	156	1.4	31.0
GP-160	0.97	45	117	1.0	15.0
HS-320	0.97	45	170	1.0	30.0

^a: pores per inch

세포의 고정화 및 전처리

250ml flask에 배지 100ml와 polyurethane foam을 넣고 15분간 120℃로 멸균한 뒤 shaker에서 30℃, 초기 pH 5.6, 200rpm의 조건으로 4일간 배양시켰다. 접종은 agar slant에 보관했던 포자를 멸균한 증류수로 희석하여 1ml씩 접종하였다. 4일간 배양 후 부유세포와 polyurethane foam에 고정화된 세포를 배양액에서 여과하고, 담체의 잔여 배지를 제거하기 위하여 증류수로 세척하고, 다시 담체에 영향을 미치지 않는 acetone으로 세척한 후 clean bench에서 2일간 말려 건조시킨 후 냉동보관 하였다.

세포 농도의 측정

부유 세포의 농도는 배양액 중의 균체를 여과하고 증류수와 아세톤으로 각각 세번씩 세척한 뒤 100℃에서 1일간 건조시킨 후 무게를 측정하여 결정하였다. 고정화된 세포의 경우는 앞에서와 같은 방법으로 건조한 후 무게를 측정하고, sodium hypochloride solution(10%, v/v)으로 세포를 제거한 뒤 polyurethane foam만의 무게를 측정하여 그 차이로부터 구했다.

효소의 활성도 측정

효소의 활성은 Kwon등의(14) 방법을 약간 수정하여 사용하였는데 올리브유 emulsion의 가수분해로부터 생성되는 지방산의 농도를 copper soap colorimetry방법으로 측정하였다.

올리브유 emulsion은 20ml올리브유에 polyvinylalcohol solution (1%, w/v) 100ml를 넣고, 얼음으로 냉각하면서 10,000rpm으로 15분간 혼합하여 제조하였다. Cupric acetate-pyridine 용액은 5%(w/v) cupric acetate 수용액에 pyridine을 첨가하여 pH를 6.1로 조절하여 사용하였다. 올리브유는 Sigma제품을 사용하였고, 기타 사용한 시약은 특급

시약이었다.

20ml screw-cap tube에 10ml n-hexane과 0~25 μ mol의 oleic acid를 넣어 표준시료를 만들었으며, 이의 분석 결과로부터 표준 곡선을 만들어 사용하였다. 표준시료 5ml를 시험관에 옮긴 뒤 cupric acetate-pyridine용액 1ml를 첨가한후 vortex mixer로 90초 동안 혼합하면서 발색시켰다. 10~20초 동안 방치하여 수용액상과 oleic acid가 추출된 n-hexane을 분리시킨 후, 상등액의 흡광도를 측정하였다. 발색액의 흡광도는 spectrophotometer를 이용해 n-hexane을 blank solution으로 하여 전 과정에서 scanning해본 뒤 704nm에서 측정했다.

시료중의 효소 활성을 측정하기 위하여 20ml screw-cap tube에 5ml의 올리브유에 10ml의 0.1M acetate buffer (pH 5.7), 1ml의 0.05M $CaCl_2$ 를 효소원과 같이 넣고, 37 $^{\circ}C$, 150rpm의 조건으로 교반시키면서 한 시간 동안 반응시켰다. Intracellular lipase의 활성을 측정하기 위하여 사용된 세포의 양은 40-50mg이었고, extracellular lipase의 활성을 측정하기 위해서 배양액 1ml를 사용하였다. 반응 후 n-hexane 10ml를 넣고, 100 $^{\circ}C$ 의 항온조에서 10분간 끓이면서 교반시켰다. 이후에 5ml의 상등액을 분리한 뒤 발색시켜 흡광도를 측정하였다. 효소반응에 의해서 생성된 oleic acid의 양은 표준곡선을 이용하여 계산하였다. 리파아제의 활성도는 unit로 나타내고, 1 unit는 위의 반응조건 하에서 분당 생성된 1 μ mol의 지방산이 생성됨을 의미한다.

결과 및 고찰

*R. chinensis*의 성장 및 리파아제 생성 특성

대상균주인 *R. chinensis*의 성장 및 리파아제의 생성 특성을 조사하기 위하여 polyurethane foam을 넣지 않고 100ml의 배지를 사용하여 shake-flask에서 5일간 현탁배양 했을 때, 시간에 따른 세포의 농도와 intracellular와 extracellular lipase의 활성도를 Fig. 1에 나타내었다. 세포의 농도는 6.8g/L을 얻을 수 있었고, intracellular lipase의 활성도는 90시간 이후에 560U/L의 최대값을 보였다. Extracellular lipase의 활성도는 2,000~2,100 U/L의 값을 보였다.

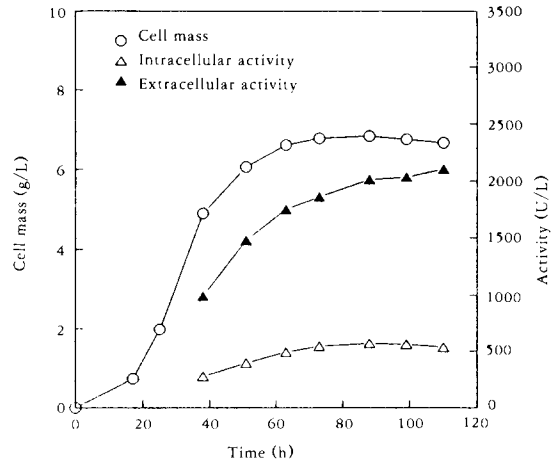


Fig. 1. Growth of *R. chinensis* and lipase activity in suspension culture. (T=30 $^{\circ}C$, pH 5.7)

Polyurethane foam의 종류에 따른 영향

사용된 polyurethane foam의 종류가 *R. chinensis*의 고정화 정도와 리파아제의 활성도에 미치는 영향을 조사하기 위하여 종류당 6~7mm크기로 자른 100개씩의 polyurethane foam을 100ml의 배지

Table 2. Effect of polyurethane foams on the immobilization efficiency and the lipolytic activity

PF	Cell mass		Lipase activity		
	Immobi-lized (g/L)	Suspen-ded (g/L)	X _{sus.} X _{total} (%)	Intracellular (U,10 ² /mg cells)	Extracellular (U,10 ² /ml broth)
GP-330	4.9	0.70	14	11.6 (568.4) ^a	60.9 (609) ^a
HR-320	5.8	0.48	7.6	14.9 (864.2) ^a	148.8 (1,488) ^a
GP-160	6.23	0.50	7.4	24.2 (1,507) ^a	134.7 (1,347) ^a
HS-320	6.31	0.66	9.5	21.7 (1,369) ^a	129.6 (1,296) ^a
without PF		6.94		12.3 (853) ^a	144.9 (1,449) ^a

PF: Polyurethane foam

^aTotal activity, U/L

X_{sus.}: Suspended cell concentration

X_{total}: Total cell concentration

가 든 flask에 넣어 4일간 배양한 결과를 Table 2에 나타내었다. 배양중 균체는 polyurethane foam 종류에 관계없이 세포가 잘 고정화되어 부유 세포의 농도가 전체 세포 농도의 10% 미만이었다. 그 중에서도 pore size가 치밀한 GP-160과 HS-320의 경우가 비교적 pore size가 큰 GP-330이나 HR-320보다 고정화 정도가 크게 나타났다. GP-330이나 HR-320의 경우 배양 후 세척등의 처리과정에서 고정화 되었던 균체의 이탈현상이 심하게 나타남을 볼 수 있었다. Polyurethane foam을 넣지않고 배양한 결과와 비교해보면, polyurethane foam을 넣었을 때의 전체 세포 농도가 GP-330와 HR-320의 경우에 약간 감소하는 것을 볼 수 있었으나, GP-160와 GP-320의 경우에는 유사한 결과를 얻었다. 결과적으로 polyurethane foam에 의한 세포의 성장에는 영향이 없음을 알 수 있었다. 고정화 시킨 경우의 리파아제의 활성도는 현탁배양의 경우보다 크게 나타났다. 이는 생체 지지물질에 의해 사상균의 pulp-like formation이 억제되고, pellet-like formation이 촉진되어 intracellular lipase의 활성도에 영향을 미친다는 Kauto와 Linko (12)의 연구결과와 유사하다. 네 종류의 polyurethane foam 중에서 GP-160와 HS-320을 담체로 사용한 경우에 고정화 효율이 가장 좋고, 현탁 배양에 비하여 intracellular lipase의 비활성도는 약 2배 가량 높일 수 있다. *R. chinensis*를 고정화 하기 위하여 여러종류의 polyurethane foam(PF)을 담체로 사용한 Nakashima 등(13)은 PF의 종류에 따라 고정화 양은 3~5.7g/L이고, intracellular lipase와 extracellular lipase의 activity가 각각 0.023~0.05U/mg-cells, 0.70~3.0U/ml인데 반하여, 본 연구에서는 PF의 종류에 따라 균체의 고정화양은 4.9~6.3g/L로 다소 높고, intracellular lipase의 activity는 0.116~0.242U/mg-cells로 약 5배 가량 높다. 반면에 extracellular lipase의 activity는 0.60~1.50U/ml로 약 2배 가량 낮다. 즉, 본 연구에서 사용된 PF가 고정화율이 높고, extracellular lipase의 생성을 억제하고 intracellular lipase의 생산을 향상 시킴을 알 수 있다.

Polyurethane foam의 크기에 따른 영향

사용된 polyurethane foam의 크기에 따른 고정화 효율과 리파아제의 활성도를 조사하기 위하여 GP-160를 4~5mm(150개), 7~8mm(80개), 10~11(41개)를 100ml배지 속에 넣고 배양하였다. 이때,

각각의 배양액에 첨가된 polyurethane foam의 부피는 동일하다. Polyurethane foam의 크기에 따른 연구결과를 Table 3에 제시하였다. Polyurethane foam의 크기가 증가함에 따라 polyurethane foam (PF)개당 고정화량은 예상대로 증가하지만, 전체 고정화량은 큰 차이가 없음을 알 수 있다. Intracellular specific activity는 4~5mm인 경우가 가장 컸으며, 입자 크기가 증가함에 따라 감소하는 것을 알 수 있다.

Table 3. Effect of bead size of polyurethane foams (GP-160) on the immobilization efficiency and the lipase activity

Bead size (mm)	Immobilized cell mass		Lipase activity	
	total (g/L) ^a	specific (mg/PF)	Intracellular (Ux10 ² /mg cells)	Extracellular (Ux10 ² /ml broth)
4-5	6.3	4.2	19.7 (1,241) ^b	120 (1,200) ^b
7-8	6.8	8.5	16.3 (1,108) ^b	167 (1,670) ^b
10-11	6.6	16	11.4 (752) ^b	270 (2,700) ^b

^a Number of polyurethane beads: 4-5mm (150 particles), 7-8mm (80 particles), 10-11mm (41 particles)

^b Total activity, U/L

Polyurethane foam의 양에 따른 영향

Polyurethane foam의 부피가 고정화 효율과 리파아제의 활성도에 미치는 영향을 조사하기 위하여 100ml배지에 각각 100, 150, 200개의 4~5mm 입자를 넣고 4일간 배양시킨 후 그 결과를 Table 4에 제시하였다. 본 연구에서의 polyurethane foam의 최대 갯수는 교반시 배양액에 완전히 입자가 잠길 수 있는 양을 갯수로 하였다. 담체의 사용 갯수에 따른 세포의 고정화는 100개의 경우에 세포가 고정화하기 위해 필요한 담체의 부족으로 고정화 효율이 나쁘지만, 150개의 bead를 사용한 경우에 대부분의 세포가 담체에 고정화 되었고, extracellular lipase의 활성도가 가장 낮다. 고정화 된 균체의 전체 활성도도 이와 유사한 경향을 보여 150개를 넣을 경우 1,238U/L로 가장 높게 나타났다. 200개의 담체를 넣었을 경우(pore volume: 24.2cm³)부유 세포는 전체 세포의 3% 미만으로 거의 모든 세포가 고정화 되지만,

Table 4. Effect of amount of polyurethane foams (GP-160) on the immobilization efficiency and the lipase activity

Number of bead	Cell mass		Lipase activity	
	Immobilized (g/L)	Suspended (g/L)	Intracellular (Ux10 ² /mg cells)	Extracellular (Ux10 ² /ml broth)
100(12.1) ^a	4.5 (4.5) ^b	2.47	21.5 (967) ^c	168 (1,680) ^c
150(18.2) ^a	6.1 (4.06) ^b	0.26	20.3 (1,238) ^c	137 (1,370) ^c
200 (24.2) ^a	5.7 (2.84) ^b	0.17	18.7 (1,066) ^c	144 (1,440) ^c

^a pore volume, cm³; ^b cell mass, mg/bead; ^c total activity, U/L

polyurethane foam의 양이 증가함에 따라 세포의 성장에 어느정도 영향에 저해를 줄을 알 수 있다.

고정화 세포의 흡착강도

Cell polyurethane foam에의 흡착강도를 알아보기 위해 세포의 고정화된 7~8mm와 4~5mm의 polyurethane foam 1g을 각각 100ml 증류수가 든 flask에서 비교적 큰 교반속도인 500rpm으로 교반시키면서 시간에 따른 세포의 누출정도를 살펴보았다(Fig. 2). 두가지 모두 교반초기에 세포의 누출이 심했으며 각각 5%와 20% 정도의 감소를 보였다. 1시간 이후의 세포의 누출정도는 크게 감소하여 10시간 후 각각 85%, 53%의 세포가 polyurethane

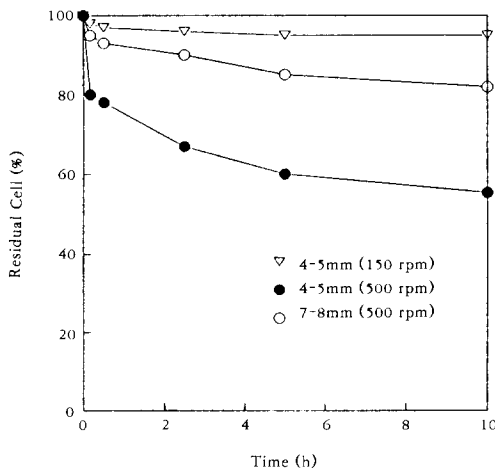


Fig. 2. Adsorption intensity of immobilized cells.

foam내에 남아 있었다. 효소의 활성을 측정하기 위해 150rpm으로 교반시킬 경우에는 세포의 누출이 거의 없음을 볼 수 있었다.

시간에 따른 고정화 정도와 효소의 활성도

배지 100ml에 세포의 누출이 적은 7~8mm polyurethane bead를 1g 넣고 시간에 따른 고정화 정도와 균체내의 리파아제의 활성도의 변화를 살펴보았다. Fig. 3은 시간에 따른 pH 변화와 polyurethane foam에 고정화 세포의 농도와 부유 세포의 농도를 나타낸 것이다. 이때, 고정화 세포의 농도는 고정화

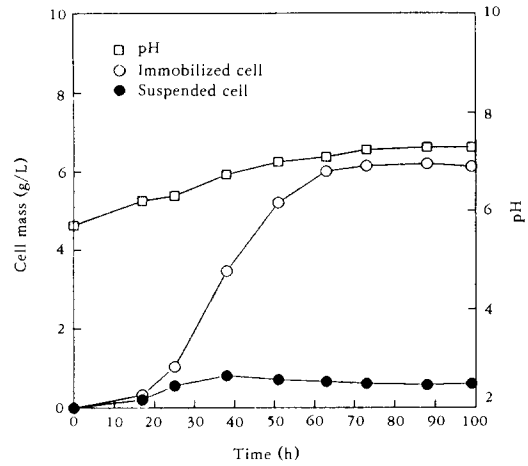


Fig. 3. Growth of *R. chinensis* with polyurethane foams (polyurethane foam: GP-160, dp=7-8mm, pH 5.7).

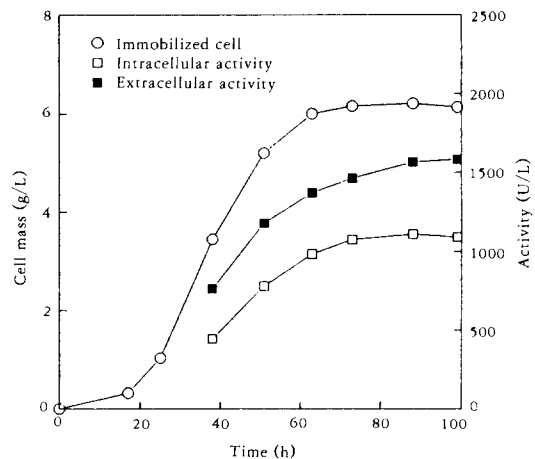


Fig. 4. Lipase activity with polyurethane foams (polyurethane foam: GP-160, dp=7-8mm, pH 5.7).

된 전체의 양을 배지의 부피로 나누어 농도의 형태로 나타낸 것이다. 최종적으로 얻어진 전체 세포 농도는 현탁 배양의 세포 농도(Fig. 1)와 별다른 차이를 보이지 않았다. 부유 세포의 농도는 40시간 부근에서 최대를 보였고 그 후로 약간 감소한 후 일정한 값을 얻을 수 있었다.

Fig. 4는 고정화 세포의 농도와 intracellular와 extracellular lipase의 activity를 나타낸 것이다. 고정화 배양과 현탁 배양(Fig. 1)에서 총괄 리파아제의 활성도는 약 2,500U/L로 유사한 결과를 얻었지만, polyurethane foam을 사용한 결과 intracellular lipase의 활성도가 현탁 배양 보다 약 2배 이상 증가하였다.

고정화 세포의 열안정성

지방의 에스테르화나 가수분해등의 생체촉매로서 polyurethane foam에 고정화된 세포를 사용할 경우를 가정하여 intracellular lipase의 활성도에 대한 열 안정성을 조사하였다. 고정화 세포를 pH 7.4의 citrate buffer 10ml에 넣고, 각각의 온도에서 1, 2, 5, 8시간 동안 유지시킨 다음 남아있는 균체내의 활성을 측정하였다. Fig. 5는 시간에 따른 각 온도에서의 활성 감소를 변성시키기 전의 활성을 기준으로하여 나타낸 것이다. 그 결과 50℃일 경우 8시간 이후에 대부분의 활성을 잃었고, 35℃의 경우에 비교적 열안정성이 높은 것으로 나타났다. 리파아제의 비활성화가 1차식을 따른다는 가정하에서 Arrhenius

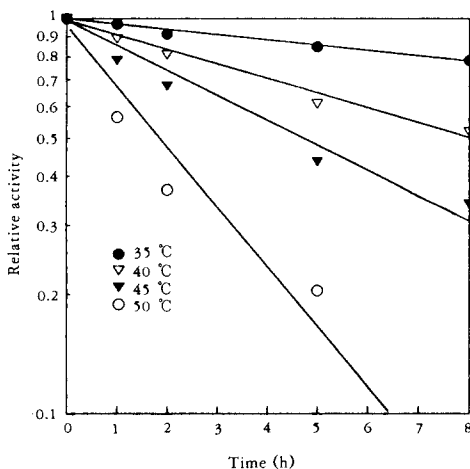


Fig. 5. Thermal stability of immobilized cells (polyurethane foam: GP-160, dp=7-8mm).

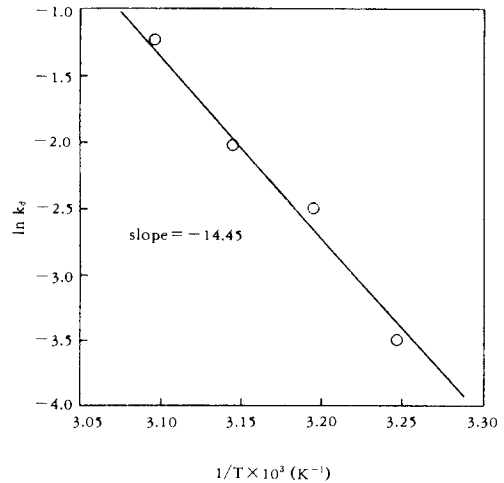


Fig. 6. Arrhenius plot of thermal deactivation.

plot(Fig. 6)를 이용하여 얻은 비활성화 에너지는 28.7kcal/mol로서 Shaw(5)등이 *Candida rugosa* lipase를 PVC에 고정화시킨 후 구한 값 27~33.15kcal/mol과 거의 유사한 값을 보였다. 따라서, polyurethane foam에 고정화된 세포는 생체촉매로서의 열안정성이 나쁘지 않음을 알 수 있었다.

결론

담체로 사용된 polyurethane foam은 *Rizopus chinensis*의 균사가 부착하여 안정하게 증식할 수 있게 하였다. 고정화를 위해 사용된 네 종류의 polyurethane foam중 GP-160이 고정화 매체로 우수한 성질을 보였고, 입자의 크기는 7-8mm가 적당하였다. *Rhizopus chinensis*의 현탁 배양과 polyurethane foam에서의 고정화 배양을 비교할 때, 전체 리파아제의 활성도는 큰 변화가 없었지만, 고정화 배양의 경우 extracellular lipase의 생성을 억제하여 intracellular lipase의 활성도를 현탁 배양의 경우보다 약 2배 가량 높일 수가 있었다. 고정화 세포의 열안정성을 조사하기 위하여 35~50℃ 사이에서 열에 의한 비활성화 에너지값을 구해본 결과, 그 값이 28.7kcal/mol로서 본 연구에서 제조된 고정화 세포의 생체촉매가 비교적 좋은 열안정성을 갖고 있다.

참고문헌

1. W. Gerhartz (1990), *Enzymes in Industry: Pro-*

- duction and Application*, p. 89 (W. Gerhartz ed.), VCH, Weinheim.
2. F. Bjorkling, E. Godfredsen, and O. Kirk (1991), *TIBTECH*, **9**, 360.
 3. Y. Kosugi and H. Tanaka (1990), *Biotechnol. and Bioeng.*, **36**, 617.
 4. A. Macrae (1983), *JAOCS*, **60**(2), 291.
 5. J. F. Shaw, R. C. Chang, F. Wang and Y. J. Wang (1990), *Biotechnol. and Bioeng.*, **35**, 132.
 6. A. M. Klibanov (1983), *Science*, **219**, 727.
 7. I. Chibata, I. Tosa and M. Fugimura (1983), *Annual reports on Fermentation Process*, (L. N. Ornston, A. Balows and P. Baumann eds), **6**, 2, Palo Alto, California.
 8. G. J. Salter and D. B. Kell (1991), *Current Opinion in Biotechnology*, **2**, 385.
 9. G. M. Block, C. Webb, S. Matthew and Atkinson (1984), *Biotechnol. and Bioeng.*, **26**, 134.
 10. F. Mavituta and J. M. Park (1985), *Biotechnol. Lett.*, **7**, 647.
 11. P. K. Nath, Y. Izumi and H. Yamada (1990), *Enzyme Microb. Technol.*, **12**, 28.
 12. H. Kautora and Y. Linko (1990), *Appl. Biochem. Biotech.*, **25**, 161.
 13. T. Nakashima, H. Fukuda, S. Kyotani and H. Morikawa (1988) *J. Ferment. Technol.*, **66**(4), 441.
 14. D. Y. Kwon and J. S. Rhee (1986), *JAOCS*, **63**(1), 89.