

微生物 固定化에 관한 研究*

第 1 報. *Lactobacillus* 菌의 固定化條件

李 康 洽

仁荷大學校 化學科

(1981년 6월 10일 수리)

Immobilization of Microorganisms

Part 1. Preparation of Immobilized *Lactobacillus bulgaricus*

Kang-Heup Lee

Department of Chemistry, Inha University, Inchon, Korea

Abstract

The immobilization of *Lactobacillus bulgaricus* was investigated by various method, e.g. by use of polyacrylamide gel and Al-, Ca-, Fe- or Mg-alginate beads, and the most active immobilized cells were obtained by entrapment in a Ca-alginate beads. These immobilized microbial cells, when introduced into 4.5% lactose solution and whey solution showed maximum relative activity of 28% or lactose solution and 18% for whey solution as measured against the native microbial reference standard (100).

緒 論

1960年代 後半 이후, life science에 관련하여 酵素法이라든가, 醱酵法과 같은 生化學反應을 이 용하는 生化學工業 특히 酵素工業의 발전에 따라 固定化酵素系의 중요성이 인식되어 이에 대한 數 많은 연구가 있어왔고¹⁾ 工業的이용에 까지 이룬 例 또한 알려져 있으나²⁾ 菌體內的 酵素는 菌體外에 추출하면 不安定化하는 경우가 많으므로 이를 해소하기 위하여 微生物菌體 그 자체를 固定化하여 固體觸媒로서 이용하고자 하는 연구가 근래 주목되고 있다.

微生物의 固定化는 1966年 Mosbach³⁾에 의한 地衣類의 固定化후, 많은 연구⁴⁾가 있고 그 응용 분야는 여러 면에 걸쳐 있어서, 근래 sucrose 轉化⁴⁾, steroid 變換⁵⁾, 抗生物質⁶⁾ 및 水素⁷⁾의

생산등 有用한 물질의 생산에 관한 것이 그 대부분이며, 그 방법 또한 polyacrylamide gel⁸⁾, agar gel⁹⁾, cellulose triacetate polymer¹⁰⁾, collagen film¹¹⁾, zirconium hydroxide와의 결합¹²⁾, glutaraldehyde¹³⁾, Ca-alginate⁶⁾ 및 k-carrageenan¹⁴⁾ 등 많은 방법이 보고되어 있으나 상기 polyacrylamide gel에 의한 包括法이 공업화의 例¹⁵⁾에서와 같이 보편적 방법으로 알려져 있다.

본 연구에서는 固定化한 微生物에 의한 有機性 廢水의 淨화를 목적하여 微生物菌體로서 *Lactobacillus* 菌株를 선정, whey에 응용하기 위한 기초 실험으로 菌體의 固定化방법으로서 polyacrylamide gel과 多糖類의 일종인 metal alginate bead의 제조를 시도하여 몇가지 결과를 얻었기 이에 보고하는 바이다.

* 본 연구는 「1980년도 문교부 학술연구조정비」에 의하여 연구된 것으로 이에 사의를 표합니다.

材料 및 方法

1. 材料

Acrylamide, *N,N'*-methylene-bis-acrylamide (MBA), *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine (TEMED), ammonium persulfate (APS), sodium alginate, aluminium chloride, calcium chloride, ferric chloride, magnesium chloride 및 lactose 는 關東化學 또는 和光試藥製 1級 또는 特級試藥을 그대로 사용하였다. whey 는 서울牛乳(株) 水原工場 cheese plant 에서 제공받아 常法¹⁶⁾에 따라 除蛋白후 滅균하여 供試하였다.

2. 菌 株

供試菌株로는 *Lactobacillus bulgaricus* 를 서울대학교 농과대학 식품공학과에서 분양받아 다음과 같이 種培養하였다.

種培養: Pederson¹⁷⁾의 방법에 준하여 500ml 용 三角플라스코에 T.G.Y. (Tryptone glucose yeast extract) medium 에 Na-thioglycolate 0.5% 를 첨가한 培地 200ml 을 넣고 121°C, 15분간 고압살균후 菌을 접종하고 37°C, 24시간 靜置培養하였다.

이를 滅菌共栓遠心管에 옮기고 5,000 r.p.m. 에서 30분간 遠沈하고 physiological saline 200ml 로 세척, 再遠沈하여 種菌으로 하였다. 이때의 生菌數(viable cell count)는 optical density 0.6~1.0 이 되게 physiological saline 으로 희석하여 供試하였다.

3. 菌株의 固定化

1) Polyacrylamide gel 법: 일정량의 acrylamide 와 MBA 를 일정량의 脫이온수에 용해한 용액 일정량(例: 38% acrylamide+5% MBA 용액 20 ml)에 5% APS 용액 및 25% TEMED 용액을 각각 1ml 씩 가하고 다음 供試菌株 1ml 을 가한후, D'Souza & Nadkarni⁴⁾의 방법에 준하여 증합하였다. 생성한 gel 은 약 27mm³ 내외가 되게 절단하고 滅균증류수로 세척한 후, 1~4°C 에서 보관하여 실험에 供하였다.

2) Metal alginate bead 법: 供試菌株 1ml 씩을 현탁한 2% sodium alginate 용액 50ml 을 각각 1%의 AlCl₃, CaCl₂, FeCl₃ 및 MgCl₂ 용액

300ml 에 注射器를 통하여 Morikawa⁶⁾의 방법에 준하여 각각 滴下하고, 생성되는 bead 를 濾別하여 滅균증류수로 세척한 후, 1~4°C 에서 보관하여 실험에 供하였다.

4. Lactose 분해실험

250ml 용 三角플라스코에 3.에서 제조한 固定化菌株를 넣은후, 4.5% lactose 용액 또는 처리 whey 액 50ml 씩을 각각 가하고 초기 pH 를 6.0 으로 한후, 37°C±3°C 로 유지하면서 靜置, 24시간후 용액을 꺼내고 다시 용액을 가하여 위와 같이 반복실험하였다.

5. 분해활성의 算定

위의 4.에서 분해실험한 용액은 酸度の 증가를 N/50 NaOH 용액으로 Friedman & Graeser¹⁸⁾의 방법에 준하여 滴定하였으며, 한편 生菌에 의한 분해실험과 盲檢실험을 위의 4.와 같이 각각 행하여 N/50 NaOH 용액 소비량에 의한 酸度에서 분해량을 환산하고 生菌에 의한 분해실험결과를 100으로 한 백분율로서 상대적 활성을 나타내었다.

結果 및 考察

1. 菌株의 固定化

1) Polyacrylamide gel(PAA gel)법에 의한 固定化條件

PAA gel 법에 의한 固定化菌株 제조시, acrylamide 및 MBA 농도에 따른 4.5% lactose 용액의 lactose 분해실험에 의한 상대적 활성은 Table 1 과 같다.

Table 1 에서 보면 상대적 활성이 Acrylamide 와 MBA 의 농도에 따라 차이가 있고 가장 양호한 것이 각각 Acrylamide 38% 및 MBA 5% 일 때이나, 이는 gel 化에 의한 격자구조형성이 농도에 영향을 받는다는 것을 알 수 있으며, 더우기 生菌에 비하여는 그 활성이 불과 최고 18% 로 현저히 저하되고 있음을 보여주고 있다. 이는 증합 반응이 발열반응으로 菌의 不活性化가 일어난다고 여겨지며, 따라서 가령, 효모⁴⁾의 경우 상대적 활성이 70%인 것으로 보아 많은 菌株에서 보인 보편성 있는 방법으로 알려진 PAA gel 법에 의한 固定化는 *L. bulgaricus* 의 경우, 固定化방법으로

서는 양호하지 않다고 추정된다.

Table 1. Lactose decomposition effect of *L. bulgaricus* immobilized with various concentration of acrylamide and MBA.

Acryl amide (%)	MBA (%)	Relative activity* (%)
25	4	13
	5	16
	6	10
38	4	14
	5	18
	6	11
50	4	12
	5	14
	6	9

* Total activity in intact cells before entrapment was taken as 100.

2) Metal alginate bead 에 의한 固定化條件

a) Bead 형성

金屬鹽인 AlCl₃, CaCl₂, FeCl₃ 및 MgCl₂에 의한 각각의 Metal alginate bead 형성결과는 Table 2와 같다.

Table 2. Result of bead formation in metal alginate gel.

Gelation reagent	Result
AlCl ₃	good
CaCl ₂	fairly good
FeCl ₃	good, colored
MgCl ₂	no beads formed

Table 2에서 보면 가장 양호한 형성능은 Ca鹽이며, Mg鹽의 경우 형성되지 않는 것으로 보아 多價의 金屬鹽과 sodium alginate와의 반응에서 선택성이 있음을 나타내고 있다. 또한 Fe鹽의 경우, 특유의 赤色으로 착색되어 있어서 형성능이 비슷한 Al鹽에 비하여는 그 이용에 있어 제한된다고 추정된다.

b) 각종 bead 별 lactose 분해실험

Metal alginate bead 법에 의해 제조한 3종의 固定化菌株 bead의 4.5% lactose 용액의 lactose 분해 실험에 의한 상대적 활성은 Table 3과 같다.

Table 3에서 보면 金屬鹽의 종류에 따라서도 상대적 활성에 큰 차이가 있고, 가장 양호한 것은

Table 3. Lactose decomposition by immobilized *L. bulgaricus*: relative activity of several immobilized bead forms.

Carrier	Relative activity* (%)
Al-alginate bead	18
Ca-alginate bead	28
Fe-alginate bead	trace

*Total activity in intact cells before entrapment was taken as 100.

Ca鹽이나, 生菌에 비하여는 그 활성이 불과 28%로서 우수하다고 할수없는 결과이었다. 원래 Ca원자는 이온결합성의 交叉結合으로 많은 algin酸의 chain을 결부시킨다고 알려져있어 이는 대조적인 결과이나, algin酸에서는 pyranose環이 약 90° 각도로 결합하고 있어서 zigzag 狀으로 굴곡하고 있다는 微細構造¹⁹⁾에 기인하는 것으로 추정된다.

c) Bead 粒徑별 lactose 분해실험

Ca-alginate bead 固定化菌株의 粒徑에 따른 4.5% lactose 용액의 lactose 분해실험에 의한 상대적 활성은 Table 4와 같다.

Table 4. Effect of immobilized Ca-alginate bead diameter on lactose decomposition.

Diameter of immobilized Ca-alginate bead (m/m)	Relative activity* (%)
1	24
2	28
3	25

*Total activity in intact cells before entrapment was taken as 100.

Table 4에서 보면 粒徑에 따른 상대적활성은 큰 차가 없다고 볼수 있으나, 粒徑이 작을수록 작아짐은 비표면적과의 관계로 볼때 이 결과만을 가지고 추정할 수 없고 따라서 더 작은 粒徑에 대한 더 많은 실험결과가 있어야 할 것으로 사료된다.

2. Whey 처리실험

4.5% lactose 용액의 lactose 분해실험결과 가장

좋은 결과를 얻은 粒徑 2m/m의 Ca-alginate bead 로 제조한 固定化菌株에 의한 whey 처리 실험 결과는 Table 5와 같다.

Table 5. Lactose decomposition result in whey by immobilized *L. bulgaricus*.

Carrier	Relative activity(%)		
	<i>L. bulgaricus</i>	Reuse (No.1)	Reuse (No.2)
Immobilized with Ca-alginate bead (diameter 2m/m)	18	9	trace
Intact cells	100	-	-

Table 5에서 보면 whey 처리 실험의 경우, 처음 사용시의 상대적 활성이 최고 18%로서 4.5% lactose 용액의 lactose 분해 실험에서의 상대적 활성 최고 28%에 비하여는 상당히 저하된 결과이었으며, 재사용시에는 급격히 그 활성이 감소하여 2회 재사용시에는 이미 그 활성은 흔적을 나타내었다. 이 결과로 보면 whey 시료가 除蛋白質이라고는 하나, 타의 성분 예컨대 無機質등이 도리히 抑制적으로 작용하는 것으로 추정된다. 그러나 재사용시의 활성저하는 원래, 固定화가 生菌에 대한 상대적 활성이 낮아도 재사용의 利點을 보유하므로써 보상할 수 있을진대, 이점 비록 양호하지 않다고 하더라도, PAA gel 법에 비하여는 상대적으로 양호한 것이므로 *L. bulgaricus*의 Ca-alginate bead 에 의한 固定化는 가능성이 있다고 추정된다.

끝으로 본 연구를 수행함에 있어 실험에 많은 협조와 실험결과에 대해 토론해 주신 서울대·농과대학 교수 이계호 박사에게 감사의 뜻을 표합니다.

抄 錄

Lactobacillus bulgaricus 菌體의 固定化方法으로서 polyacrylamide gel 과 Al-, Ca-, Fe- 및 Mg-alginate bead 에 대하여 考察하고 이중 가장 활성이 좋은 것은 Ca-alginate bead 이었으며 粒徑 2m/m로 형성시킨 Ca-alginate bead 로 固定化시킨 菌株의 경우, 4.5% lactose 용액 및 whey 에서의 lactose 분해 실험 결과, 生菌에 對한 상대적 활성은 각각 최고 28% 및 18% 이

었다.

參考文獻

1. 千畑一郎: 固定化酵素, 講談社サイエンティフィック, 東京(1975)
2. Tosa, T. et al.: *Enzymologia*, 31 : 214 (1966)
3. Mosbach, K. and Mosbach, R.: *Acta Chem. Scand.*, 20 : 2807 (1966)
4. D'Souza, S.F. and Nadkarni, G.B.: *Enzyme Microb. Technol.*, 2 : 217 (1980)
5. Yamane, T. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, 21 : 2133 (1979)
6. Morikawa, Y. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, 21 : 261 (1979)
7. Karube, I. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, 22 : 221 (1980)
8. Martin, C.K.A. and Perlman, D.: *Biotechnol. Bioeng.*, 18 : 217 (1976)
9. Toda, K.: *Biotechnol. Bioeng.*, 17 : 1729 (1975)
10. Dineli, D.: *Proc. Biochem.*, 7 : 9 (1972)
11. Vieth, W.R. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, 15 : 565 (1973)
12. Kennedy, J.F. et al.: *Nature*, 261 : 242 (1976)
13. Petre, D. et al.: *Biotechnol. Bioeng.* 20 : 27 (1978)
14. Takeda, I. et al.: *Enzyme Microb. Technol.* 2 : 31 (1980)
15. Tosa, T. et al.: *Appl. Microbiol.*, 27 : 878 (1974)
16. Merck: *Handbook of Microbiology*, p.66 (1965)
17. Pederson, C.S. and Albury, M.N.: *Appl. Microbiol.*, 4 (5) : 259(1956)
18. Friedemann, T.E. and Graeser, J.B.: In 'Method in Food Analysis', M.A. J. Slyn (ed.), 2nd Ed., p.433, Academic Press, N.Y. (1970)
19. 沖増 哲, 金谷 昭子(著): 食品高分子化學, p.123, 醫齒藥出版, 東京(1971)