

# Production of Dye-decolorizing Enzyme using Molasses-containing Medium

Tae Ho Lee<sup>1,2</sup> and Makoto Shoda<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Research Laboratory of Resources utilization, Tokyo Institute of Technology

<sup>2</sup> Institute for Environmental Technology and Industry, Pusan National University (Current address)

Tel) 052-510-3049

e-mail) thlee0@hyowon.pusan.ac.kr

Production of dye-decolorizing enzyme was investigated with the cultivation of *Geotrichum candidum* Dec1 (abbreviated to Dec1) using molasses as a cheap raw materials. Molasses was found to stimulate the enzyme production as well as a role of carbon source, because the production increased with molasses content up to 50 g/L. However, the severe inhibition of dye-decolorizing enzyme activity was observed even at low concentration of molasses 10 g/L when purified decolorizing peroxidase was used. Its inhibitory effect was reduced through the cultivation of Dec1. The fractions of molasses separated by a gel chromatography showed the different degrees of inhibition. As a way to reduce the inhibitory effect, the dilution of culture broth was examined, and the total decolorizing activity for Reactive blue 5 increased 7 times as much as that of original culture broth by 30 times dilution. On the basis of result, we proposed a process scheme which can fully utilize both positive and negative effect of molasses in dye-decolorizing process using molasses.

## 1. 서론

인간문명에 있어서의 염료의 중요성은 잘 알려져 있다. 최근의 역사에 있어서 염료는 자연으로부터의 채취에서 합성으로 그 생산방식이 변해왔다. 현재 매년 새로운 azo 계 염료들이 개발되고 있다. 합성염료들은 섬유공업이나 염료공장에서 발생하는 폐수로부터 방출된다. 이들 염료들의 필수조건으로서 빛과 세탁에 대한 안정성, 미생물에 의한 높은 저항성 등을 들 수 있다 (1). 그러므로 일반적인 합성염료들은 쉽게 분해되지 않으며 전형적인 수처리 공정으로는 물로부터 제거되지 않는다. 비록 대부분의 염료들에 의한 오염의 경우 다른 공업으로부터의 PAH에 비해 특별히 높은 독성을 가지는 않지만(1), 여전히 하나의 심각한 오염문제로 인식되고 있다. 화학 구조에 있어서 거의 대부분의 염료들은 azo 계, anthraquinone 계, triarylmethane 계 등으로 분류되며 이 중 azo 계 염료들이 주로 산업에서 이용되고 있다(10). Azo 계 염료들은 가장 다양한 색을 가졌으며 종류도 다양하다. 이들 염료들은 특성상 질소분자가  $sp^2$ -hybridized carbon atom을 가진 aromatic ring 과 연결된 azo group을 포함하는 것으로 때로는 sulfonic acid group을 포함한다. Azo 결합 및 aromatic sulfon 기는 생물체에 의해 합성되지 않으며 이들에 대한 생분해에 대해서는 잘 알려지지 않고 있다.

경제적 산업배지로서 이용되고 있는 여러 폐기물 중에 설탕추출 후 대량 생성되는 폐당밀(molasses)은 풍부한 탄소원과 질소원을 함유하고 있기 때문에 여러 발효공정에 이용되고 있다. 그러나 폐당밀은 Maillard 반응에 의해 발생하는 melanoidin이라는 천연고분자물질을 함유하므로 폐액이 검은 색을 띠는 문제점을 가진다. 더욱이 이들 물질들은 antioxidant로 작용하여 미생물에 대해 독성을 가지므로 미생물에 의한 처리가 용이하지 않다(2).

본 연구에서는 Kim 등에 의해 분리 동정된(3) *Geotrichum candidum* Dec1(Dec1)을 이용한 염료탈색공정개발의 한 부분으로서 폐당밀로부터의 탈색효소 생산에 대해 검토하였다. 염료탈색효소 생산과 동시에 폐당밀의 동시탈색, 폐당밀의 탈색효소 생산 및 활성에의 영향 등을 종합적으로

고려한 공정설계에 접근하고자 하였다.

## 2. 폐당밀로부터의 합성염료 탈색효소 생산 및 폐당밀 동시탈색

폐당밀 이외의 염 및 당농도의 영향을 알아보았다. 당의 경우에는 약 30 g/L이상이 가장 좋았으며 이는 세포농도와 효소생산 및 폐당밀 탈색과의 관계로서 설명할 수 있다. 질소원의 경우에는 여러 무기질소원 중 ammonium tartrate가 가장 우수한 것으로 나타났으며 그 농도는 0.5g/L에서 최적이었다. 이는 효소의 생산이 질소원 제한 등 성장이 둔화되었을 때 증가함과 일치하는 결과이다. 폐당밀의 탈색은 균체성장이 활발한 시간영역에서 주로 이루어졌으며 이는 여러 복합물질로 구성된 폐당밀내의 색소들은 Dec1이 생산하는 염료탈색효소에 의한 것이 아님을 의미한다고 할 수 있다. Dec1의 지속적인 효소생산 및 폐당밀 탈색활성을 알아보고 또한 현장 site에서의 적용 가능성을 조사하기 위해 고정화세포를 이용한 비멸균 시스템을 이용한 repeated fed-batch 조업을 약 60 일간 수행하였다. 그 결과 약 8번 정도까지는 폐당밀 탈색 및 효소생산이 가능하였으며 반응기 내 세포농도는 최대 16 g/L까지 유지되었다.

## 3. 폐당밀의 탈색효소 생산 및 활성에의 영향

본 연구에서 사용된 폐당밀 배지는 그 경제성뿐만 아니라 다른 복합배지에 비해 월등한 탈색효소생산에 중요성이 있다 할 수 있다. 동일한 당농도로 조절한 뒤 단지 폐당밀 농도를 달리 한 실험에서 폐당밀 농도가 높을수록 탈색효소활성이 높게 나타났다. 이는 폐당밀이 단지 탄소원 공급의 역할뿐만 아니라 효소생산의 유도 또는 촉진하기 때문으로 사료된다. 그러나 폐당밀은 효소 자체의 활성에는 심각한 저해효과를 가지는 것으로 나타났으며 이를 조사하기 위해 분리 정제된 탈색효소 (dye decolorizing peroxidase ;DyP)를 사용해 그 영향을 알아보았다. 그 결과 5 g/L의 저농도 폐당밀에서도 효소활성이 50% 정도 감소하는 것을 알 수 있었으며 이는 폐당밀이 효소생산 촉진과 효소활성 저해라는 두 가지 상반된 효과를 가짐을 나타내는 것이라 할 수 있다. 이러한 저해효과는 분자량에 따른 gel chromatography의 폐당밀 각 분획에서 각각 다르게 나타났으며, 또한 배양 중 균체에 의해 상당량 저해효과가 감소됨을 알 수 있었다. 이러한 두 결과를 종합하여 효율적 공정을 도출하고자 배양액을 희석하여 저해효과를 감소시키는 방법을 적용하여 그 결과 30배 희석한 경우 원래의 배양액에 비해 약 7 배의 총활성 증가를 나타내었다.

## 4. 결론

폐당밀을 이용한 탈색효소 생산은 탄소원 공급 이상의 생산 촉진 효과가 있는 것으로 나타났다. 기 생산된 효소활성저해라는 문제점을 함께 보여주었다. 따라서 폐당밀 최적농도에서의 조업을 고려하였으나 두 최적농도 영역이 차가 크므로 사실상 폐당밀 농도 조절에 의한 최적화는 불가능하였다. 따라서 생산된 효소액을 염료를 포함한 합성배액으로 1:30 희석하는 공정을 도입하여 총 탈색 활성을 증가시킬 수 있었다.

## 5. 참고문헌

1. Miyata N., Iwahori K., Fujita M. *J. Ferment. Bioeng.*, 85, 550-553 (1998).
2. Kim S.J., Ishikawa K., Hirai M., and Shoda M. *J. Ferment. Bioeng.*, 79, 601-607 (1995).