

막분리 공정을 이용한 과산화수소 함유 폐액처리용 카탈라제 생산

허병옥¹ · 이동철 · †신현재
(주)엔지뱅크, ¹충북과학기술대학교 바이오생명정보과
(접수 : 2003. 3. 21., 게재승인 : 2003. 6. 27.)

Catalase Production by Membrane Process for Treatment of Industrial Wastewater Containing Hydrogen Peroxide

Byoung-Ok Heo, Dong-Cheol Lee¹, and Hyun-Jae Shin[†]
EnzBank, Inc., 309 BVC, KRIBB, Yusong, Daejeon 305-333, Korea

¹Department of Biotechnology, Chungbuk Provincial University, Okcheon, Chungbuk 305-333, Korea

(Received : 2003. 3. 21., Accepted : 2003. 6. 27.)

This study aims to develop an economic process for the treatment of industrial wastewater containing hydrogen peroxide by using catalase. Core process is characterized by two membranes; microfiltration membrane and ultrafiltration membrane with different molecular cut-offs. Optimum dilution ratio of *Aspergillus niger* molds to buffer solution is 1:5. The final recovery yield of the enzyme is over 90% using this process. The enzyme solution shows the optimum temperature of 40°C and pH range of 5-8.

Key Words : Catalase, *Aspergillus niger*, hydrogen peroxide, membrane process

서 론

자연계에 존재하는 다양한 활성산소 가운데 과산화수소 (hydrogen peroxide, H₂O₂)는 표백제, 산화제, 유도체 제조 등에 광범위하게 사용되는 화학물질로서 최근에는 인쇄기판에 청용, 반도체 제조용으로 그 수요가 확대되고 있는 실정이다 (1). 이와 더불어 섬유, 화학, 전자 산업의 발달과 더불어 고순도 과산화수소의 사용량은 계속적으로 증가되고 있어 이러한 과산화수소를 함유한 폐액의 양도 증가될 것으로 예상된다. 생화학적 방법으로 과산화수소를 처리하기 위해서는 카탈라제(catalase, E. C. 1.11.1.6)를 사용하는 것이 일반적이다 (2, 3).

카탈라제는 일반적으로 헴그룹 (heme group)을 갖는 산화/환원효소로서 진핵세포의 퍼옥시좀에 다량 함유되어 있으며 특히 동물의 간에 다량 존재한다(4). 카탈라제를 생산하는 방법으로는, 살균제로써 톨루엔, 자일렌, 에틸아세테이트, 클로로포름 등을 처리하여 몰드 (mold)의 사멸 뒤 자기분해에 의한 방법으로 추출하고, 아세톤, 에탄올, 메탄올, 황산암모늄 등을 이용하여 침전, 회수하고, 수용성 용매 또는 물에 재용

해 후 비수용성 물질을 제거하여 효소액을 제조하는 방법이 대표적이다(5, 6). 동물의 간으로부터 생산되는 카탈라제는 그 양이 산업적으로 이용되기에 부족하나 페니실리움 속 미생물 혹은 *Aspergillus niger*와 같은 미생물로부터 높은 효소 활성을 가지는 카탈라제가 생산되면서 산업적인 용도로써 개발되기 시작하였다(7). 그러나 현재 국내에서는 카탈라제의 생산은 이루어지지 않고 전량이 수입되어 사용되고 있는 실정으로 본 효소제의 국산화가 시급한 실정이다. 본 연구의 목적은 막분리 기술을 이용하여 국내에서 저렴하게 구입이 가능한 폐포자를 처리하는 환경친화적인 공정을 개발하는 것이다.

재료 및 방법

Aspergillus niger 폐포자

본 연구에 사용된 균체는 병세척, 반도체 세척, 시멘트 혼화제, 전해탈지제, 세제, 화장품, 식품 첨가물 등의 용도로 글루콘산소다 (sodium gluconate)를 생산하는데 사용된 *Aspergillus niger* 폐포자로서 국내의 경기도 이천에 소재한 M 기업으로부터 공급 받아 본 연구에 사용하였다. 성상은 암갈색의 스폰지 형태를 띠고 있다.

효소액 제조 및 활성 확인

상기한 *Aspergillus niger* 폐포자 1 g을 취하여 0.05 M

† Corresponding Author : EnzBank, Inc., 309 BVC, KRIBB, Yusong, Daejeon 305-333, Korea
Tel : +82-42-864-0057, Fax : +82-42-864-0058
E-mail : shinhj@enzbank.com

potassium phosphate 완충액 (pH 7.0)을 사용하여 폐포자를 2회 세척한 후 각각 5에서 20배수의 완충액을 가하여 현탁한 후 sonicator (Branson sonifier model 450)를 사용하여 균체를 파쇄하였다. 이 외에 Bead beater (Biospec Co.)를 이용하여 균체 파쇄를 수행하였다. 각각의 균체를 파쇄 후 10,000 g에서 20분간 원심 분리를 통하여 균체를 제거하였다.

효소의 활성은 15 mM의 과산화수소를 기질로 25°C에서 5분간 항온 시킨 후, 각각의 효소추출액을 첨가하여 2-3분간 240 nm에서 감소되는 흡광도를 측정하였다. 1 unit는 25°C, pH 7.0의 조건에서 1분간 1 μmol의 과산화수소를 분해시키는 양을 1 unit로 정의하였다.

미세여과 (microfiltration)

고속원심분리기를 이용하여 1차적으로 균체가 제거된 조효소액을 원심분리단계에서 제거되지 않은 미세입자 제거를 위하여 0.2 μm의 pore 크기를 가지는 미세 여과막 (microfiltration membrane)을 Sartorius사에서 구입하여 사용하였다.

고분자 한외여과 (high ultrafiltration)

미세여과를 통하여 0.2 μm 이상의 고분자량의 물질들을 제거한 액에서 250 KDa 가량의 카탈라제 효소액을 분리하기 위하여 10 KDa에서 300 KDa의 pore 크기를 가지는 고분자 한외여과막을 Sartorius사에서 구입하여 사용하였다. 세포의 파쇄에서부터 막분리까지 전체적인 실험과정을 Fig. 1에 나타내었다.

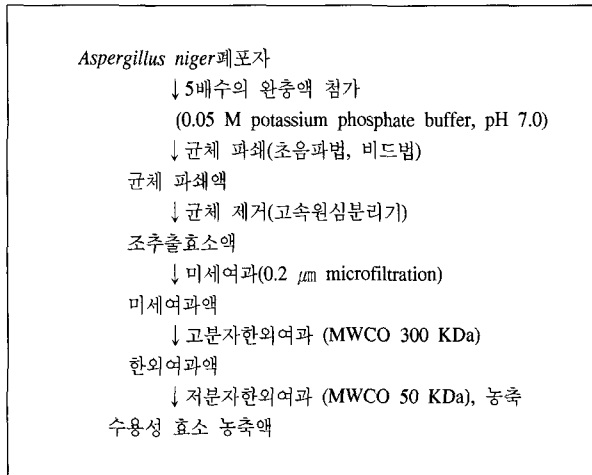


Figure 1. Schematic diagram of catalase production from *Aspergillus niger* by membrane separation process.

결과 및 고찰

균체추출 최적화

Fig. 2는 초음파법에 의해 균체파쇄 후 얻어진 효소추출액의 카탈라제의 활성을 보여주고 있다. *Aspergillus niger* 폐포자는 3배수의 완충액이 첨가된 경우에는 현탁액이 조업수행이 곤란할 정도로 점도가 높아, 최소 5배수 이상의 완충액이

첨가되어야 균체파쇄공정을 수행할 수 있는 현탁액 상태가 되었다. 각각 완충액의 첨가배수를 달리하여 추출 효능을 비교한 결과 5배수로 첨가한 추출액에서 효소활성도 (activity/단위부피)가 가장 높았고, 효소비활성도 (specific activity)도 다른 효소추출액에 비하여 가장 높게 나타났다. 균체 파쇄 후 회수된 전체 추출액에서의 효소 총활성도 (total activity/총부피) 또한 5배수로 첨가한 추출액에서 가장 높았다. 이를 통해 현탁액 내의 고형물의 농도가 가장 중요한 요인으로 작용함을 알 수 있었다.

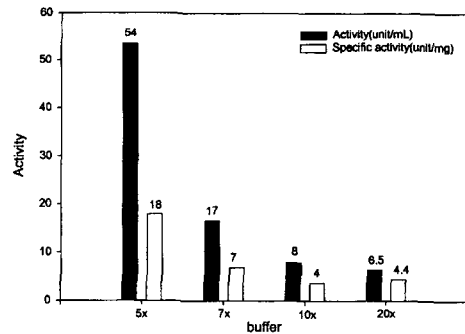


Figure 2. Comparison of catalase activity after disruption by sonication cell; *A. niger* 1 g, buffer; 0.05 M potassium phosphate buffer (pH 7.0).

다음으로 대용량 규모의 포자분쇄를 위하여 다이노밀 (Dyno-mill)이나 볼밀 (ball mill)과 같은 산업적으로 많이 이용되고 있는 bead를 이용한 마쇄법으로의 적용가능성을 알아보기 위하여 bead를 사용하여 *Aspergillus niger* 폐균주를 파쇄한 후 추출된 효소의 활성을 비교하였다. 실험은 초음파법과 동일하게 폐포자 1 g을 취하여 5, 7, 10, 20배수의 완충액을 가하고 여기에 bead 5 g을 동일하게 가한 후 교반하여 추출을 수행하였다. 마쇄법에 의해 얻어진 효소추출액은 동일한 완충액의 첨가배수에 대하여 초음파법에 비하여 다소 활성이 적게 나타났다 (data not shown). 그 이유는 동일한 양의 완충액 조건에서 균체의 농도가 낮아 균체와 bead가 마찰이 잘 이루어지지 않은 결과로 보이며 이는 현탁액 내의 폐포자 농도와 bead 양을 조절함으로써 충분히 해결될 수 있을 것으로 사료된다.

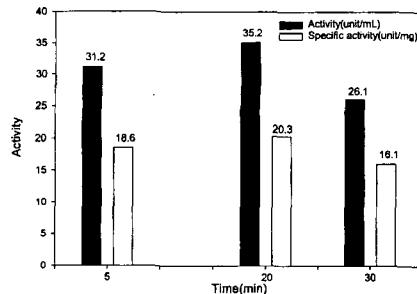


Figure 3. Comparison of catalase activity by extraction time added 10x buffer solution.

추출에 사용된 완충액의 양과 함께 조업시간을 결정하는 주요한 요인으로 추출소요 시간을 들 수 있다. 실험은 각각의 *Aspergillus niger* 폐포자에 점도에 의한 균체파쇄차이를 줄여 추출조건을 동일하게 할 수 있도록 10배수의 완충액을

동일하게 가하여 완충액 내의 폐포자 농도가 일정하도록 크게 현탁하고, duty cycle 30%, output 3의 조건으로 초음파법을 통하여 수행하였다. 시간을 달리한 효소추출액의 활성은 20분간 추출한 시료액에서 20 unit/mg으로 활성이 가장 높게 나타났으며 추출 시간이 가장 짧은 5분간 추출된 효소액에서 18 unit/mg의 비활성도를 보였고, 이보다 추출시간을 오래한 30분간 추출된 추출액에서의 효소활성은 5분간 추출된 추출액의 효소활성보다 낮은 16 unit/mg의 비활성도를 보였다(Fig. 3).

미세여과공정

파쇄공정과 원심분리공정을 통해 생산된 조효소액을 0.2 μm의 pore 크기를 가지는 미세여과막 (microfiltration membrane)을 이용하여 처리하였다. 막의 여과에 있어서 조업 시간을 결정하는 중요한 요인은 막 면적과 운전조건에 따른 시간당 여과량 (flux)이다. 따라서 운전조건에 따른 여과량의 측정을 통하여 막면적 및 운전조건을 조절함으로써 조업시간을 조절할 수 있었다. 미세여과를 위한 교차흐름 막여과 (cross flow)방식의 여과장치를 사용할 때 운전조건에 따른 여과량의 변화를 Fig. 4에서 보여주고 있는데, 막 횡단 압력 (TMP)이 증가할수록 용액의 여과속도가 좋아짐을 보여주고 있다. 그러나 여과막이 물리적으로 견딜 수 있는 압력이 존재하기 때문에 여과속도를 올려주기 위하여 막 횡단 압력을 무리하게 증가시킬 경우 오히려 retentate의 압력에 의해 펌프가 저항을 받아 feed 속도가 감소되며 여과막이 물리적인 파손을 일으킬 수 있기 때문에 무리한 막 횡단 압력의 증가보다는 적정 막 횡단 압력과 액의 공급압력, retentate 압력 조건에서 운전하면서 막 면적 조절을 통하여 여과속도를 조절하는 것이 바람직하다. 액의 공급압력 (Pi)이 1.5~2.5 bar, retentate 압력 (Po)은 0~0.5 bar의 범위에서 운전하여 막 횡단 압력이 1~1.5 bar가 되도록 운전하는 것이 최적의 여과속도를 낼 수 있는 운전조건이다. 그러나 여과막의 장기 사용을 위해서는 가능한 한 낮은 압력에서 운전하는 것이 여과막의 장기적 사용에 유리할 것으로 사료된다.

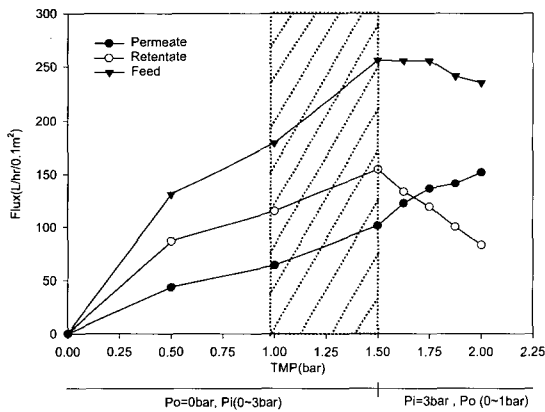


Figure 4. Change of flux depending on the operation condition membrane: 0.2 μm hydrosart microfiltration membrane Pi: inlet pressure, Po: outlet pressure, TMP: transfer membrane pressure. ‖ optimal operation condition.

고분자 한외여과 (high ultrafiltration)

미세여과를 통하여 0.2 μm 이상의 고분자량의 물질들을 제거한 액을 300 KDa의 pore크기를 가지는 고분자 한외여과막을 통하여 300 KDa이상의 고분자량의 물질들을 순차적으로 제거하였다. 본 연구에서 얻고자 하는 *Aspergillus niger*로부터 추출된 과산화수소 함유 폐액처리용 효소인 catalase는 분자량 약 250 KDa의 크기를 가지는 tetramer이므로 300 KDa의 고분자 한외여과막의 여과를 수행하여 정제하였다. 미세여과와 마찬가지로 교차흐름 막여과 방식의 여과장치에서 막 횡단 압력이 증가할수록 용액의 여과속도가 좋아짐을 보여주고 있다(Fig. 5). 또 막 횡단 압력을 무리하게 증가시킬 경우 오히려 retentate의 압력에 의해 펌프가 저항을 받아 액의 공급 속도가 감소되는 모습을 보여주고 있어 고분자한외여과 역시 액의 공급압력 (Pi)이 1.5~2.5 bar, retentate 압력 (Po)은 0~0.5 bar의 범위에서 운전하여 막 횡단 압력이 1~1.5 bar가 되도록 운전하는 것이 최적의 여과속도를 낼 수 있는 운전조건임을 보여주고 있다.

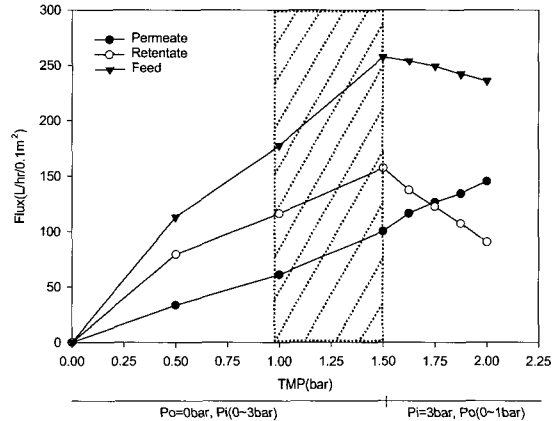


Figure 5. Change of flux depending on the operation condition membrane: 300 KDa polysulfone ultrafiltration membrane Pi: inlet pressure, Po: outlet pressure, TMP: transfer membrane pressure. ‖ optimal operation condition.

저분자한외여과 (low ultrafiltration)

고분자한외여과 (300 KDa)를 통하여 분자량 300 KDa이상의 고분자 물질들을 제거한 여과액을 작은 pore 크기를 가지는 저분자 한외여과막을 이용하여 농축하는 과정을 통하여 작은 크기의 저분자량의 물질들을 제거하면서 카탈라제 분획을 농축, 회수하였다. 액의 공급압력이 1.5~2.5 bar, retentate 압력은 0~0.5 bar의 범위에서 운전하여 막 횡단 압력이 1~1.5 bar가 되도록 운전하는 것이 최적의 여과속도를 낼 수 있는 조건임을 알 수 있었다(data not shown).

활성 및 회수율

Table 1에는 본 공정의 전체 단계인 조추출효소액 (단계1), 미세여과액 (단계2), 고분자 한외여과액 (단계3), 효소농축액 (단계4)들의 활성과 각 단계에서의 수율 (recovery yield)을 나타내고 있다. 단계5에서 50 KDa 미만의 저분자 물질들이 제거되는 여과액 내의 효소활성을 확인한 결과 카탈라제 효소활성을 보이지 않음으로써 효소성분의 손실이 없음을 확인할 수 있었다.

Table 1. Activity and recovery of the purification step from *Aspergillus niger*

단 계	활성도 (unit/mL)	고유활성도 (unit/mg)	회수율(%)
1. 조추출효소액 (crude extract)	50	16	100
2. 미세여과액 (0.2 μm미만)	49	17	99
3. 고분자 한외여과액 (300 KDa미만)	48	19	98
4. 저분자 한외여과농축액 (50 KDa-300 KDa)	340	55	92
5. 저분자 한외여과액 (50 KDa미만)	0	0	0

효소의 생화학적 특성

Aspergillus niger 폐포자로부터 추출하여 회수한 카탈라제의 온도와 pH 의존성에 대해 조사한 결과 최적값은 각각 40°C와 5-8 범위 였다(Fig. 6). 현재 실패수를 대상으로 효소의 활성에 미치는 첨가제, 안정제, 중금속의 영향 및 공정 적합성에 관한 연구가 진행 중이다.

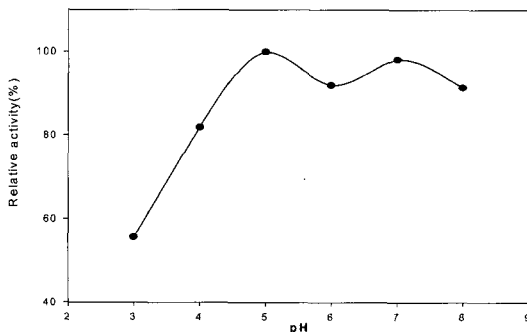
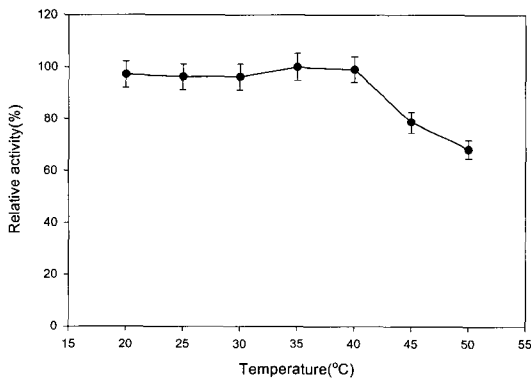


Figure 6. Effect of substrate temperature and pH on the relative activity of catalase from *Aspergillus niger*.

요 약

본 연구는 *Aspergillus niger* 폐포자를 이용하여 과산화수소를 함유한 폐액처리용 효소제조 공정개발에 그 목표가 있다. 본 카탈라제 (catalase) 생산 공정은 미세여과(0.2 μm, microfiltration)와 한외여과 (300 KDa, 50 KDa, ultrafiltration)의 순차적인 막 여과 방식을 통하여 효소액을 회수하는 것을 특징으로 한다. 초기 폐포자와 완충액의 회석비는 1 : 5 였으며 막분리 공정의 수율은 90% 이상이었다. 얻어진 카탈라제 용액의 최적 온도는 40°C, 최적 pH는 5-8 영역이었다.

감 사

본 연구는 과학기술부에서 지원하는 2001년도 연구성과 지원사업의 사업비로 진행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Christensen, B. E. and Holte, Catalase its production and use, *US Patent* 5, 571719 (1996).
- Sawyer, D. T. and J. S. Valentine (1981), How super is superoxide?, *Acc. Chem. Res.* **14**, 393.
- Mavelli, I. (1982), Superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in oxidative hemolysis : A study of Fanconi's anaemia erythrocytes, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **106**, 286-290.
- Murthy, M. R. N., T. J. Reid III, A. Sicignano, N. Tanaka, and M. G. Rossmann (1981), Structure of beef liver catalase, *J. Mol. Biol.* **152**, 465-499.
- Dwight L. B., Production of catalase from mold, *US Patent* 2, 635069 (1953).
- Hans E. D., Method of extracting catalase from liver, *US Patent* 2, 992167 (1961).
- Yang, H. S., H. C. Yang, and Y. Tani (1988), Catalase from *Aspergillus niger* KUF-04, *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **16**(3), 193-198.