

카탈라제를 생산하는 고초균 (*Bacillus sp.*)의 고정화 및 과산화수소 분해 특성

한경아^{1,6} · 장윤희^{3,6} · 이종일^{2,4,5,6*}

¹전남대학교 물질생물화학공학과, ²응용화학공학부, ³신화학소재공학과, ⁴촉매연구소, ⁵바이오광사업단, ⁶기능성 나노 신화학 소재 사업단

Immobilization of *Bacillus sp.* Strains, Catalase Producing Bacteria and Their Hydrogen Peroxide Removal Characteristics

Kyung-Ah Han^{1,6}, Yun-Hee Jang^{3,6}, and Jong Il Rhee^{2,4,5,6*}

¹Department of Material and Biochemical Engineering

²School of Applied Chemical Engineering

³Department of Advanced Chemicals

⁴Research Institute for Catalysis

⁵Research Center for Biophotonics

⁶Center for Functional Nano Fine Chemicals, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

Abstract In this work we have investigated the production of catalase from *Bacillus sp.* strains, which were screened and identified from soil. These strains were cultivated in shaking flasks with tryptic soy broth (TSB) at 30°C and 200 rpm. Effects of the temperature and pH on the stability of the native catalase and whole cell viability were studied in the temperature range of 25-60°C and the pH range of 7-13. Korean natural zeolite was added to culture medium and mixed with microorganisms for 24 hours. The native catalase maintained its activity over 50°C. The enzyme activity of the catalase from *Bacillus flexus* BKChE-3 was highest among the *Bacillus sp.* strains studied. *Bacillus flexus* BKChE-3 and immobilized *Bacillus* cells have survived under extreme conditions of over 50°C and pH 12. 60 mL of 10.5 mM H₂O₂ solution were entirely removed within 1 hour with catalase produced from *Bacillus sp.* on the flask. When *Bacillus* cells were immobilized on Korean natural zeolite, colony forming unit of *Bacillus flexus* BKChE-3 was increased and high efficiency of hydrogen peroxide removal was observed.

Keywords: Catalase, Hydrogen peroxide, *Bacillus sp.*, Immobilization, Zeolite

서 론

과산화수소 (Hydrogen peroxide, H₂O₂)는 표백제, 산화제 등에 광범위하게 사용되는 화학물질로 인쇄기판의 에칭, 반도체 산업, 세척염색공업 및 제지 공업, 콘택트렌즈 소독 등과 유제품이나 발효 식품 공정 중 미생물 제거를 위해 사용되는 등 그 수요가 확대되고 있다. 노화방지, 웰빙 등에 대한 현대

인들의 관심이 늘고 있어 환경 친화적 기술인 생화학적 방법으로 과산화수소를 처리하기 위한 생물 효소에 관한 연구가 보고되고 있다 [1-3]. 과산화수소를 분해하는 카탈라제는 동물, 미생물, 식물 등 다양한 생물로부터 생산이 가능하다. 동물의 간으로부터 생산되는 카탈라제는 그 양이 산업적으로 사용하기에는 부족하고 고가이기 때문에 *Penicillium*이나 *Aspergillus niger*와 같은 미생물로부터 높은 효소 활성을 가지는 카탈라제에 관한 생산기술이 발달함으로써 산업적인 용도로 사용되기 시작하였다 [4-6].

이들 미생물로부터 얻은 효소를 반복적으로 사용하기 위해 키토산, 키토산 필름, 다공성 유리, 셀룰로스, 실리카겔, 알루

*Corresponding author

Tel: +82-62-530-1847, Fax: +82-62-530-0846

e-mail: jirhee@chonnam.ac.kr

미나, 글리옥실 아카로스, 키토산 비드 등에 고정화하는 연구가 보고되었다 [7-11]. 기존의 효소 고정화 방법을 대처하기 위해 알지네이트, κ -카라기난, 아가, 키토산, 폴리갈락투로닉산, 젤라틴, 콜라겐, 폴리비닐알코올 등에 미생물 균체를 고정화하는 방법이 연구되었다 [12-15]. 미생물 균체를 고정화하면 발효 생산물의 생산량 증가 효과를 기대할 수 있고 연속 공정을 실시할 수 있다. 또한 생산물과 미생물의 분리, 여과 및 정제 등의 과정을 생략할 수 있어서 공정이 단순해져 공정비용을 절감할 수 있다. 뿐만 아니라 생산물을 수확한 후 미생물을 회수 및 재활용이 가능하고, 반응기 내 전단력 (shear force)으로부터 미생물 균체를 보호할 수 있으며 미생물의 높은 조밀도로 인해 오염의 위험을 줄일 수 있는 장점을 가진다 [16].

제올라이트는 촉매, 흡착제, 탈수제, 세제 등에 첨가제로 많이 쓰이는 물질로 양이온 교환 성질, 산/염기성을 가지는 다공성의 결정성 물질이다. 특히 천연 제올라이트는 채굴의 편의성으로 합성 제올라이트에 비해 가격이 매우 싸면서도 양이온 교환, 흡착 등의 제올라이트 특성을 활용할 수 있는 장점을 가진다 [17].

본 연구에서는 미생물 균체 고정화 지지체로 친환경 소재인 천연 제올라이트의 사용 가능성에 관하여 조사하였다. 카탈라제를 생산하기 위해 스크리닝한 세 가지 미생물 중 과산화수소 제거에 가장 효과적인 미생물을 제올라이트에 고정하여 그 특성을 조사하였다. 최종적으로 효소 생산 비용 및 산업 폐수 처리 비용 문제를 개선하기 위하여 천연 제올라이트에 고정화한 고초균의 특성과 과산화수소를 분해하는 성능을 조사하였다.

재료 및 방법

균주 및 시약

본 연구에 사용된 시약 및 완충 용액 제조용 시약 등은 시그마 회사 (Sigma Co., USA)에서 구입하였다. 미생물 배양에 사용한 TSB (tryptic soy broth) 복합배지는 비디 회사 (BD Co., USA)의 제품을 사용하였다. 제올라이트는 한두교역 (Han-Doo Co., Korea)에서 구입한 것으로 클리넨타일로라이트계의 천연 제올라이트 (50 mesh, CEC: cation exchange capacity 100 meq/100 g)이다.

배양 조건

활성이 높은 카탈라제를 생산하는 세 가지 균주 (*Bacillaceae bacterium* BKBCHE-1, *Bacillus sp.* BKBCHE-2와 *Bacillus flexus* BKBCHE-3)를 TSB 복합배지에 접종하여 진탕배양기 (30°C, 200 rpm)로 전 배양 (pre-culture)하였다. 본 배양은 100 mL의 TSB 복합배지에 1% (v/v) 접종하여 상동의 조건으로 24시간 배양한 후 미생물의 생존성과 물리·화학적 고

정화 특성을 조사하였다 [18].

과산화수소 농도측정

과산화수소 농도는 Mo 등 [19]의 방법을 이용하여 측정하였다. 미생물을 배양하여 채취한 시료와 A용액, B용액은 체적 비율이 2 : 1 : 1이 되도록 혼합하여 발색시킨 후 분광광도계 (Multiskan spectrum, Thermo Co., Finland)를 이용하여 350 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 검량선과 비교해 농도를 결정하였다. 반응에 사용한 A용액은 33 g KI, 1 g NaOH과 1 g (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O을 500 mL의 증류수 용해시켜 조제한 것이고, B용액은 10 g의 potassium hydrogen phthalate을 500 mL의 증류수에 용해시켜 제조한 것이다. 증류수에 0-0.09 mM의 농도로 만든 과산화수소 표준시료의 검량선을 작성하여 농도를 측정하는데 사용하였다.

미생물 균체를 이용한 과산화수소 제거

24시간 전 배양하여 TSB 복합배지에 멸균한 천연 제올라이트를 10% (wt/v) 농도로 첨가한 후 72시간동안 고정화하고 배양한 미생물 균체를 이용하여 10.5 mM의 과산화수소를 제거하는 실험을 수행하였다. 제올라이트에 고정화된 세 가지 미생물 균체가 과산화수소를 제거하는 경향 및 속도를 비교하여 과산화수소 분해 공정으로 활용 가능성을 조사하였다.

미생물 고정화

TSB 복합배지에서 30°C, 200 rpm에서 24시간동안 전 배양한 균주 *Bacillaceae bacterium* BKBCHE-1, *Bacillus sp.* BKBCHE-2와 *Bacillus flexus* BKBCHE-3을 Lee 등 [20]과 같이 10 g의 멸균한 제올라이트와 100 mL의 TSB 복합배지가 들어있는 250 mL 플라스크에 OD (optical density)값이 0.05가 되도록 접종하였다. 24시간동안 배양하여 Lee 등 [21]의 방법을 참고하여 정전기적 인력에 의한 자연 흡착법으로 고정화하였다. 세 가지 균주의 천연 제올라이트 담체 표면에 흡착여부는 주사전자 현미경 (FE-SEM, JEOL, Japan)으로 그 형태를 관찰하였다. 플라스크 내 고정화되지 않는 부유 미생물과 배지 성분은 제거하고 천연 제올라이트에 고정화된 펠릿을 멸균한 증류수로 2회 세척하고 80°C에서 48시간 건조하여 주사전자 현미경으로 미생물과 천연제올라이트 형태를 관찰하여 고정화 여부를 확인하였다.

고정화된 미생물의 과산화수소 제거

제올라이트에 고정화된 10 mL의 미생물 현탁액을 50 mL 과산화수소에 혼합하고 최종 과산화수소 농도가 10.5 mM이 되게 하여 고정화된 균주에서 생산되는 카탈라제와 반응시켜 과산화수소 제거 효율을 측정하였다. 시료는 10분 간격으로

채취하고 원심분리 (10000 g, 4°C, 10 min)하여 수집한 상등액 중 잔존하는 과산화수소 농도를 측정하였다.

시간에 따른 고정화 특성

과산화수소 제거 효율이 가장 높은 미생물 *Bacillus flexus* BKBChE-3을 천연 제올라이트에 고정화하며, 고정화 시간에 따른 과산화수소 제거 효과를 확인하였다. 100 mL의 TSB 액체 배지에 10% (wt/v) 제올라이트가 들어있는 250 mL 삼각플라스크에 균주를 1% (v/v)이 되도록 접종하였다. 배양한 미생물을 72시간동안 고정화하면서 12시간 간격으로 3 mL의 시료를 채취하였다. 수집한 미생물 시료는 10.5 mM의 과산화수소와 10분 동안 반응시켜 고정화 시간에 따른 과산화수소 제거 효율을 조사하였다.

온도에 따른 미생물 생존성

본 배양한 균주와 제올라이트에 고정화한 *Bacillus flexus* BKBChE-3를 채취하여 멸균된 마이크로튜브에 옮겨 4°C, 25°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C에 미생물 접종 배지를 흔들지 않고 놓아둔 채로 정치 배양 하였다. 시료는 각각 0일, 1일, 2일, 4일, 7일, 11일, 15일, 20일, 25일, 30일에 수집하였다. 멸균한 마이크로튜브에 900 µL의 멸균 증류수와 100 µL 수집한 상등액을 넣어 10배씩 순차적으로 희석 (serial dilution) 하였다. 희석된 시료는 1.5% (wt/v)의 한천 (agar)이 포함된 TSB 고체배지에 100 µL씩 로딩 (loading)하여 화염 멸균한 삼각 유리병으로 도말 (spreading)하였다. 희석 시료를 도말한 TSB 고체배지를 30°C에서 1-2일간 배양하여 Nakamura 등 [22]과 Zweifel 등 [23]의 플레이트 카운트방법을 이용하여 생균수 (CFU: colony forming unit/mL)를 측정하여 미생물의 생존성을 조사하였다.

pH에 따른 미생물 생존성

상동의 미생물을 각각 pH가 다른 (pH 7-13) 900 µL의 TSB 액체가 담긴 마이크로 튜브에 100 µL를 접종한 후 30°C에서 정치 배양하고 상동의 조건으로 0-30일에 각각 시료를 채취하였다. 100 µL의 수집한 시료를 900 µL의 멸균한 증류수가 담긴 마이크로 튜브에 넣어 10배씩 순차적으로 희석하여 TSB 고체배지에 100 µL씩 로딩하였다. 멸균한 삼각 유리병으로 고르게 도말하고 30°C에서 1-2일간 배양하여 상동의 실험방법으로 생균수를 측정하였다.

결과 및 고찰

미생물을 이용한 과산화수소 제거

Bacillaceae bacterium BKBChE-1의 균체를 24시간 동안

배양하여 10.5 mM의 과산화수소와 10분 동안 반응 시켰을 때 과산화수소가 분해되어 8.5 mM 가량 검출되었고 30분 반응 후에 4 mM의 과산화수소가 남은 것을 관찰하였다. *Bacillus sp.* BKBChE-2의 균체는 10.5 mM의 과산화수소와 반응한 지 10분 후 약 7.8 mM의 과산화수소가 잔존하였고, 30분 후 3.5 mM의 과산화수소가 검출되었다. 시간이 지남에 따라 과산화수소가 감소하여 40분 후에는 3 mM의 과산화수소가 잔존하였다. *Bacillus flexus* BKBChE-3의 균체는 10.5 mM의 과산화수소를 분해하기 시작한 지 10분 후에 7.7 mM의 과산화수소가 남아있었고, 30분 후에는 2.7 mM, 50분이 지난 후부터 1 mM의 과산화수소가 검출되었다. 미생물이 생산한 효소 상등액은 60분 이내 10.5 mM의 과산화수소를 완전히 분해하였다. 세 가지 미생물중 *Bacillus flexus* BKBChE-3이 생산한 카탈라제가 과산화수소 제거 효과가 가장 높은 것으로 확인되었다 (Fig. 1).

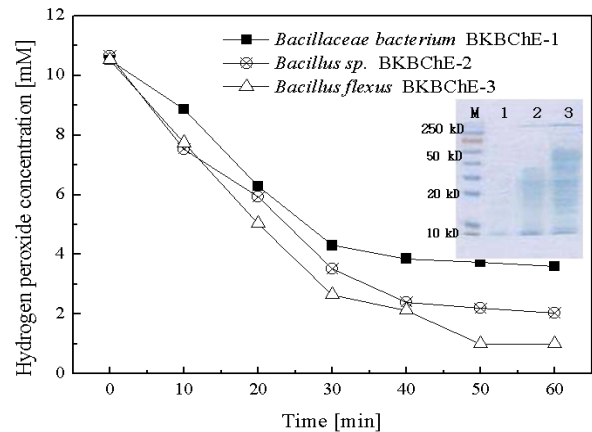


Fig. 1. Decomposition rate of hydrogen peroxide by isolated whole cells. inset: M: size marker, lane 1: *Bacillaceae bacterium* BKBChE-1, lane 2: *Bacillus sp.* BKBChE-2, lane 3: *Bacillus flexus* BKBChE-3.

미생물 고정화 특성 조사

TSB 복합배지에 24시간 동안 배양한 미생물을 제올라이트에 고정화시킨 시료는 주사전자 현미경을 통해 제올라이트 표면에 미생물이 잘 흡착된 것을 확인 할 수 있었다 (Fig. 2). *Bacillaceae bacterium* BKBChE-1이 *Bacillus sp.* BKBChE-2와 *Bacillus flexus* BKBChE-3에 비해 크기가 작은 것으로 관찰되었다. 세 가지 균주 중 *Bacillaceae bacterium* BKBChE-1은 *Bacillus sp.* BKBChE-2와 *Bacillus flexus* BKBChE-3에 비해 크기도 작고 보다 균일한 타원 형태로 좁은 면적 내 여러 개체의 균주가 조밀하게 밀집된 것을 확인할 수 있었다. 시중에서 판매되는 숯과 우레탄을 고정화 지지체로 사용한 경우, 고정된 미생물의 개체수가 많지 않았고 지지체에 균주가 고정화되는 시간도 7일 이상 걸리는 것을 확인하였다. 반면 천연 제올라이트를 고정화 지지체로 사용한 실험의 경우 24시간 동안 다른 지지체보다 많은 수의 균주가 제올라이트 표면에 부착되는 것을 확인 할 수 있었다 (데이터

표시하지 않음). 따라서 천연 제올라이트가 숯이나 우레탄에 비하여 효과적인 고정화 지지체로 나타났다.

고정화 미생물을 이용한 과산화수소 제거

10.5 mM의 과산화수소는 *Bacillaceae bacterium* BKbChE-1과 반응이 시작되자 농도가 점차 감소하여 5분 후 4 mM, 10분 후 3 mM 가량의 과산화수소가 잔존하였다. 반응 45분 후 2 mM, 55분 이후에는 과산화수소가 거의 분해되었다 (Fig. 3). *Bacillus sp.* BKbChE-2와 *Bacillus flexus* BKbChE-3의 경우, 과산화수소 분해반응 10분 후 잔존하는 과산화수소가 거의 없었다. 고정화된 세 가지 미생물 모두 10.5 mM의 과산화수소를 1시간 이내에 분해하였고, 고정화된 *Bacillaceae bacterium* BKbChE-1에 비해 *Bacillus sp.* BKbChE-2와 *Bacillus flexus* BKbChE-3가 과산화수소 제거 속도가 빨랐고, 두 미생물의 과산화수소 제거 효과는 거의 유사한 것으로 관찰되었다. 이러한 결과는 Fig. 2의 실험 결과와 비교하여, *Bacillus flexus* BKbChE-3의 균체 및 고정화 균체의 과산화수소 제거 효과가 가장 좋음을 확인할 수 있었다.

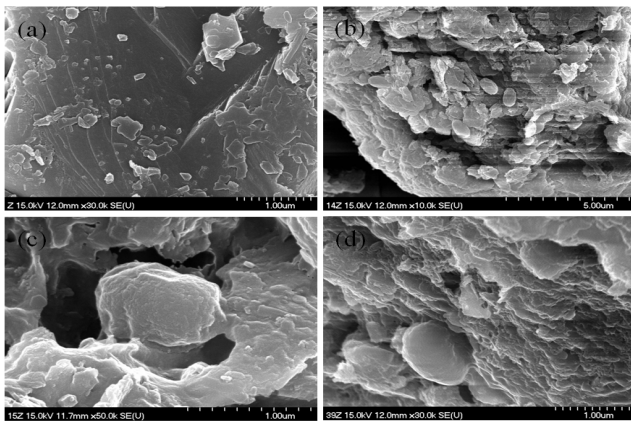


Fig. 2. Image of field emission scanning electron microscopy. (a) Korean natural zeolite (b) *Bacillaceae bacterium* BKbChE-1 (c) *Bacillus sp.* BKbChE-2 (d) *Bacillus flexus* BKbChE-3.

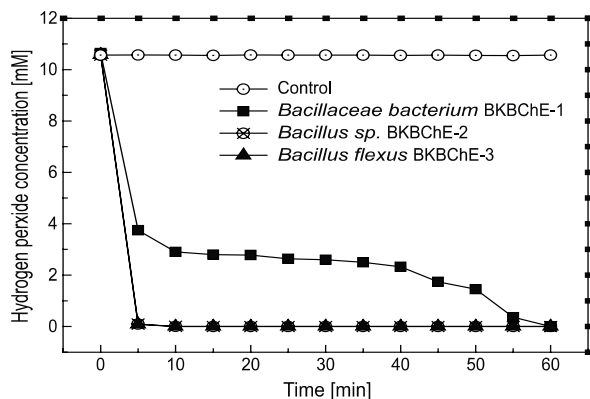


Fig. 3. Decomposition rate of hydrogen peroxide by immobilized whole cells onto Korean natural zeolite.

고정화 시간이 과산화수소 제거에 미치는 영향

과산화수소 제거 효과가 가장 좋은 *Bacillus flexus* BKbChE-3 균체로 고정화 시간에 따른 과산화수소 제거 효율을 조사하였다. 지지체인 제올라이트에 고정화하는 시간이 길수록 과산화수소를 효과적으로 제거하는 것을 확인하였다. 각각 다른 시간동안 고정화하여 얻은 시료를 과산화수소 분해 반응 시작 10분 후 잔존하는 과산화수소 농도를 기준으로 비교하여 보면, 24시간과 36시간 고정화시킨 경우 7 mM의 과산화수소가 잔존하였고, 48시간 고정화된 미생물이 분해하고 남은 과산화수소의 농도는 6 mM이었다. 지지체에 60시간 고정화시켜 얻은 시료의 경우 5 mM의 잔존 과산화수소가 검출되었다. 72시간 고정화시킨 시료는 과산화수소 분해 반응의 초기 속도는 떨어졌으나 30분 이내 과산화수소를 완전히 분해하였다. 고정화 시간에 따른 *Bacillus flexus* BKbChE-3의 과산화수소 분해 특성 실험에서 12시간-60시간 고정화한 미생물을 10.5 mM의 과산화수소 분해 실험을 시작한 지 30분 후 1.3 mM의 과산화수소가 검출되었고, 분해 반응 40분 이후에는 잔존하는 과산화수소가 검출되지 않는 것으로 확인되었다 (Fig. 4). 이들 결과는 과산화수소를 효과적으로 제거하기 위해서 *Bacillus flexus* BKbChE-3를 천연제올라이트에 오랜 시간동안 고정화시키는 것이 유용함을 보여주는 것이다.

온도에 따른 고정화 미생물 생존성

온도가 고정화된 *Bacillus flexus* BKbChE-3의 생균수에 미치는 영향을 조사한 결과 25°C, 30°C에서 30일 후 각각 8×10^{13} , 5.4×10^{13} 개의 콜로니가 관찰되었고 40°C의 경우 30일 후 1×10^{12} 개의 생균수를 확인하였다. 또한 4°C에서는 30일 이후에는 2×10^4 개, 50°C에서는 25일까지 200 여개의 콜로니가 생존하였으며 30일 이후에는 나타나지 않았다. 60°C에서는 15일까지 10 여개의 콜로니가 생존하는 것으로 관찰되었다 (Fig. 5(a)). 특히 제올라이트에 고정화한 *Bacillus flexus* BKbChE-3은 25°C, 30°C, 40°C에서 오히려 미생물의 개체수가 증가하는 경향을 나타내었다. 또한 30일까지 생존한 미생물들부터 얻은 카탈라제는 고정화 직후 얻은 효소 활성의 90% 가량의 활성이 유지되는 것으로 관찰되었다 (데이터 표시하지 않음). 이는 25-40°C의 온도가 *Bacillus flexus* BKbChE-3가 성장에 유리한 온도 조건일 뿐만 아니라 고정화지지체로 사용한 천연 제올라이트 공극 내 존재하는 산소가 미생물의 지속적인 성장에 도움을 주어 지수성장기를 오래도록 유지시켰을 뿐 아니라 Na^+ , K^+ 등의 알칼리 금속 이온이 많이 포함되어 있어 pH를 중성화시켜 미생물의 증식에 도움이 되었을 것으로 사료된다 [26].

반면 고정화하지 않은 미생물의 온도에 따른 미생물 생균수의 변화를 조사한 결과, 정지 배양 30일 이후에 4°C에서는 2×10^2 개의 콜로니가 관찰되었고 25°C와 40°C에서는 각각 1.65×10^7 , 2.24×10^7 개의 생균수가 관찰되었으며, 30°C에서는 2.44×10^6 개의 콜로니가 관찰되었다. 그리고 50°C에서는

5.12×10^4 개의 생균수를 측정할 수 있었고, 60°C에서는 30일 후 콜로니가 거의 나타나지 않았다 (Fig. 5(b)). 이들 미생물의 생균수는 Kim 등 [15]이 생균제 개발을 목적으로 연구에 사용한 *Bacillus* 생균 배양에서 측정된 결과보다 총균수가 더 많은 것으로 확인되었다. 이는 다른 연구에 비해 유용물질을 생산하는 더 많은 수의 미생물을 얻을 수 있는 가능성을 보여준 실험이다.

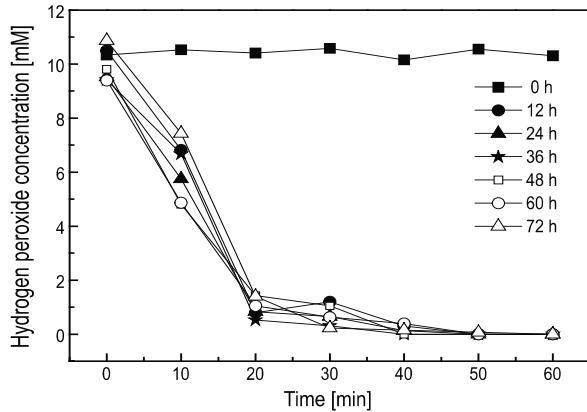


Fig. 4. Decomposition rate of hydrogen peroxide at various immobilization times with immobilized *Bacillus flexus* BKbChE-3 whole cells onto Korean natural zeolite.

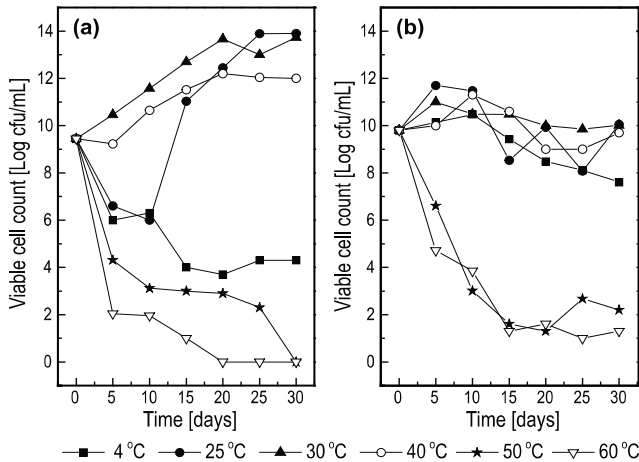


Fig. 5. Change of viable cells counts of immobilized *Bacillus flexus* BKbChE-3 incubated at various temperatures for 30 days. (a) immobilized whole cells onto Korean natural zeolite (b) whole cells.

pH에 따른 고정화 미생물 생존성

천연 제올라이트에 고정화한 미생물의 pH별 생존성 실험에서 고정화된 *Bacillus flexus* BKbChE-3 미생물은 pH 7, pH 8, pH 9의 조건에서 30일 후에 각각 6.3×10^{13} , 2.1×10^{13} , 4.54×10^{11} 개의 콜로니가 확인되었다. pH 10과 11에서는 30일 후에는 각각 8×10^8 , 4×10^5 개의 콜로니가 측정되었으며, pH 12와 13은 각각 25일과 15일이 경과한 후 10^3 여개,

10 여개의 생균수를 확인하였다. pH 13을 제외한 알칼리 영역의 pH에서도 25일까지 미생물이 생존하는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 6(a)). 다양한 pH 조건에서 실험한 제올라이트에 고정화된 미생물로부터 얻은 카탈라제 효소 활성은 30일 후에도 초기 효소 활성의 약 84% 가량의 효소 활성이 유지하는 것으로 확인되었다 (데이터 표시하지 않음). 이는 클리놉타일로라이트의 NH_4^+ 와 같은 양이온 교환 선택도가 높아 배양액 내 암모늄 이온의 제거에 효과적이기 때문인 것으로 판단된다 [25]. 한편, 고정하지 않은 균주의 pH별 생존성 실험에서 *Bacillus flexus* BKbChE-3의 경우 pH 7, pH 8, pH 9와 pH 10의 조건에서 30일이 경과한 후에 각각 6.3×10^7 , 1.14×10^6 , 3.3×10^7 , 3.3×10^6 개의 콜로니가 관찰되었다. pH 11의 조건에서는 20일까지 100 여개, pH 12에서 4일까지 200 여개의 콜로니를 확인하였고 pH 13에서는 11일까지 400 개의 콜로니를 확인하였다 (Fig. 6(b)). 이들 결과는 Costa 등 [24]의 연구에서 아무것도 첨가하지 않은 카탈라제를 pH 11에서 24시간 이후 약 50%의 활성이 잔존하는 결과와 비교하여 높은 pH 조건에서 더 뛰어난 효과이다.

다양한 온도와 pH 조건에서 고정화하지 않은 미생물의 생균수는 시간이 지남에 따라 감소하지만 천연제올라이트에 고정화한 미생물은 온도 25-40°C, pH 7-10의 조건에서 천연제올라이트로부터 공급된 산소와 이온들의 영향으로 미생물 생균수가 오히려 증가하는 경향을 보였다. 이들 결과는 천연제올라이트를 *Bacillus flexus* BKbChE-3 고정화 지지체로 사용할 경우, 추가적인 영양분 공급이 없어도 미생물 지수 성장기의 연장효과로 카탈라제 생산 미생물을 더 많이 얻을 수 있다는 것을 보여준 것이다. 배양 상등액에서 얻은 카탈라제 뿐만 아니라 고정화된 미생물의 재활용을 통해 과산화수소를 더 효과적으로 제거하여 공정비용 절감의 가능성을 확인하였다. 추후에 고정화된 *Bacillus flexus* BKbChE-3을 충전하여 반복적으로 사용할 수 있는 방법에 관한 연구가 진행된다면 연속 공정에도 유용할 것으로 기대된다.

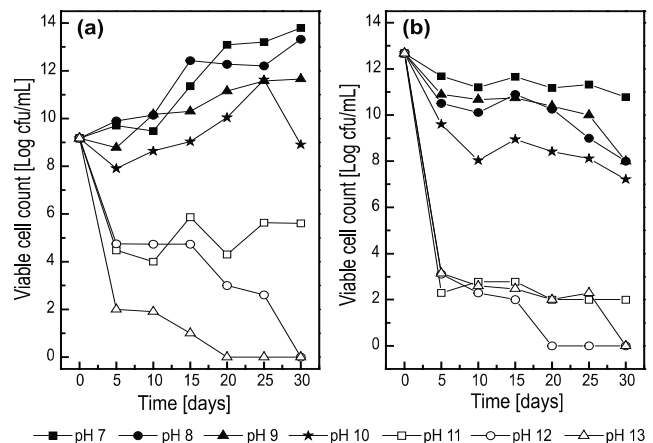


Fig. 6. Change of viable cells counts of immobilized *Bacillus flexus* BKbChE-3 incubated at various pH values for 30 days. (a) immobilized whole cells onto Korean natural zeolite and (b) whole cells.

요 약

토양 미생물로부터 스크리닝한 미생물 중 카탈라제 생산량이 높은 세 가지 미생물 (*Bacillaceae bacterium* BKChE-1, *Bacillus sp.* BKChE-2와 *Bacillus flexus* BKChE-3)을 배양하여 얻은 카탈라제 효소가 과산화수소를 분해하는 것을 확인하고, 미생물 균체를 천연제올라이트에 정전기적 흡착법으로 고정하였다. 주사전자 현미경을 통해 각각의 미생물이 지지체에 잘 흡착된 것이 관찰되었고, 10.5 mM의 과산화수소를 1시간 이내에 완전히 분해되는 것을 확인하였다. 과산화수소 분해 속도가 가장 빠른 *Bacillus flexus* BKChE-3은 온도와 pH 영향성 실험을 통해 고온과 pH 10 이상의 강알칼리 조건에서도 30일 이후까지 미생물이 생존하는 것을 관찰하였다. 또한 고정화된 미생물의 경우 온도 25-40°C, pH 7-10의 조건에서 생존수가 계속하여 증가하는 것을 확인하였다. 본 실험을 통해 *Bacillus flexus* BKChE-3이 생산한 카탈라제 효소 뿐만 아니라 고정화된 균체도 과산화수소의 제거에 효과적임을 확인할 수 있었다. 이들 결과로부터 미생물 발효를 통해 생산된 효소의 생산량 증가와 미생물 개체 수 증가를 이용하여 산업폐수에 적용하면, 과산화수소의 제거 효율을 높이고 균체 재활용을 통한 공정비용을 절감할 수 있을 것으로 사료된다.

감 사

이 논문은 지식경제부의 지방 기술 혁신 사업 (RTI04-03-03)과 post-BK21 사업의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

접수 : 2010년 9월 29일, 게재승인 : 2010년 12월 2일

REFERENCES

- Murthy, M. R. N., T. J. III. Reid, A. Sicignano, N. Tanaka, and M. G. Rossmann (1981) Structure of beef liver catalase. *J. Mol. Biol.* 152: 465-499.
- Heo, B. O., D. C. Lee, and H. J. Shin (2003) Catalase production by membrane process for treatment of industrial wastewater containing hydrogen peroxide. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 18: 186-189.
- Dwight, L. B. (1953) Production of catalase from mold. *US Patent* 2,605,069.
- Hans, E. D. (1961) Method of extracting catalase from liver. *US Patent* 2,992,167.
- Yang, H. S., H. C. Yang, and Y. Tani (1988) Catalase from *Aspergillus niger* KUF-04. *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.* 16: 193-198.
- Yu, S.-J., S.-Y. Yu, and K.-Y. Lee (2001) Influence of agitation speed on cell growth in the aerobic yeast fermentation of pulverized liquid food waste for probiotic feed production. *J. KOWREC.* 9: 99-104.
- Shinonaga, M.-A., K. Yoshihide, S. Kikuo, and Y. Tsuneo (1996) Continuous production of phospholipase D by *Streptomyces lydicus* D-121 immobilized with cross-linked chitosan bead. *J. Ferment. bioeng.* 81: 310-314.
- Cetinus, S. A. and H. N. Öztöp (2000) Immobilization of catalase on chitosan film. *Enzyme Microb. Technol.* 26: 497-501.
- Costa, S. A., T. Tzanko, P. Andreas, G. Marinka, M. G. Georg, and C.-P. Artur (2001) Immobilization of catalase from *Bacillus* SF on alumina for the treatment of textile bleaching effluents. *Enzyme Microb. Technol.* 28: 815-819.
- Hidalgo, A., B. Lorena, L.-G. Fernando, M. Renata, B. José, F.-L. Foberto, and H. G. José (2003) Design of an immobilized preparation of catalase from *Thermus thermophilus* to be used in a wide range of conditions. structural stabilization of a multimeric enzyme. *Enzyme Microb. Technol.* 33: 278-285.
- Çetinus, S. A. and Ö. H. Nursevin (2003) Immobilization of catalase into chemically crosslinked chitosan beads. *Enzyme Microb. Technol.* 32: 889-894.
- Norton, S. and T. D'Amore (1994) Physiological effects of yeast cell immobilization : application for brewing. *Enzyme Microb. Technol.* 16: 365-375.
- Park, J. K. and H. N. Chang (2000) Microencapsulation of microbial cells. *Biotechnol. Adv.* 18: 301-319.
- Kourkoutas, Y., A. Bekatorou, I. M. Banat, R. Marchant, and A. A. Koutinas (2004) Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production : a review. *Food Microbiol.* 21: 377-397.
- Kim, K., K.-I. Jang, C.-H. Kim, and K.-Y. Kim (2002) Optimization of culture conditions and encapsulation of *Lactobacillus fermentum* YL-3 for probiotics. *Korean J. Food Sci. Technol.* 34: 255-262.
- Kourkoutas, Y., A. Bekatorou and A. A. Koutinas (2004) Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food Microbiol.* 21: 377-397.
- Kam, S.-K., D.-S. Kim, and M.-G. Lee (1999) Comparison of removal performances of divalent heavy metals by natural and pretreated zeolite. *J. Korean Environ. Sci. Soc.* 8: 399-409.
- Han, K.-A. and J. I. Rhee (2009) Isolation and characterization of catalase-producing bacteria from soil. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 24: 508-514.
- Mo, S.-Y., H.-K. Chang, K.-J. Lee, G.-E. Jang, and J.-R. Sohn (2000) Measurement of the quantity of hydrogen peroxide produced in the ultrasound-irradiated aqueous solution of organic compounds. *J. Korean Soc. Environ. Eng.* 22: 61-71.
- Lee, D. H., S. J. Kim, and H. Moon (1999) Preparation

- of a clinoptilolite-type korean natural zeolite. *Korean J. Chem. Eng.* 16: 525-531.
21. Lee, S.-H., J.-H. Lee, D. G. Kim, C. S. Lee, K. S. Kang, and I. H. Kim (2008) Simultaneous removal of ammonium and nitrate by natural zeolite and bacteria. *Korean Chem. Eng. Res.* 40: 971-976.
 22. Nakamura, H., K. Samejima, and T. Zenzo (1974) A capillary tube method for counting viable cells of *Bifidobacterium bifidum* growth in a solid medium. *Japan J. Microbiol.* 18:135-138.
 23. Zweifel, C., J. E. Muehlherr, M. Ring, and R. Stephan (2005) Influence of different factors in milk production on standard plate count of raw small ruminant's bulk-tank milk in Switzerland. *Small Rumin. Res.* 58: 63-70.
 24. Costa, S. A., T. Tzanov, A. F. Carneiro, A. Paar, G. M. Gübbitz, and A. C. Paulo (2002) Studies of stabilization of native catalase using additives. *Enzyme Microb. Technol.* 30: 387-391.
 25. Yoon, T. K., G. C. Lee, B. H. Moon, T. S. Lee, and H. S. Koo (2001) Treatment of seafood wastewater by intermittently aerated activated sludge system with zeolite addition. *J. Korean Ind. Eng. Chem.* 12: 410-414.
 26. Lee, H. S. (2002) Wastewater treatment in a hybrid biological reactor using powered minerals: effects of organic loading rates on COD removal and nitrification. *Process Biochem.* 38: 81-88.