

## CNBr-activated Sepharose 4B에 고정화된 laccase에 의한 염료의 decolorization

권신, 김은정, 류원철, 조무환

영남대학교 응용화학공학부 환경생물공학연구실

전화 (053) 810-2517, FAX (053) 814-8790

### Abstract

A laccase produced the *Trametes* sp. was immobilized on CNBr-activated Sepharose 4B(CS4B) and tested for repeated-batch and continuous decolorization of dye. After immobilization, the enzyme was active in wider pH and temperature range, and its heat stability was greatly improved compared to those of the free laccase. Immobilized laccase was efficient for both repeated-batch and continuous decolorization.

### 서론

산업의 발달과 함께 각종 오염물질의 배출이 증가하고 있다. 특히 합성염료는 섬유, 종이를 비롯해 문방구, 화장품, 식품 그리고 최근에는 액정, 컬러 필름용 색소 등 전자 기기 관련분야로 폭넓게 사용되고 있으며 현재 국내 염료 생산고는 연간 약 7만 톤으로 전세계생산량의 10% 정도로 염료생산과정에서 배출되는 1차 폐수는 약 100만 톤으로 추정된다. 방향족 구조를 가지는 난분해성 물질들은 그 자체의 독성으로 인해 생물학적으로 처리하기가 어렵고, 물리화학적 처리는 새로운 문제점을 발생시키는 것으로 알려져 있다. 이러한 염료를 비교적 효율이 높은 생물학적 기술을 이용하려는 움직임이 최근에 들어와서 활발히 진행되고 있으며, 그 중에서도 특히 환경오염물질의 bioremediation기술에 적용 가능한 백색부후균에 관한 연구가 지속되고 있다. 담자균류에 속하는 백색부후균은 리그닌을 분해하는 효소 (Lignin peroxidase, Manganese-dependent peroxidase, Laccase)를 생산한다. 그 중에서도 효소의 대량생산이 가장 쉽고, 실제 산업적으로 응용가능성이 용이한 효소인 laccase의 연구가 집중되고 있다. 따라서 본 연구에서는 효소의 산업의 적용을 위한 효소의 안정성 증대 및 효소의 연속적인 재사용을 위한 고정화 laccase의 관한 연구를 수행하였다.

### 재료 및 방법

#### 효소생산

Trametes sp.(KFCC 10941)는 온도 28. C, pH 4.5에서, extracellular laccase를 생산하기 위해서 Tien, Kirk(1988)에 의해서 사용된 질소충분 액체배지에 접종하여 Laccase를 생산하였다. 생산된 효소는 Ammonium sulfate 침전을 이용하여 60~80%의 분획을 취하고, 투석한 후 ultra-filtration을 이용하여 농축한 효소를 사용하였다.

#### 효소 정량 및 decolorization 측정

Remazol Brilliant blue (RBBR)의 decolorization의 측정은 594 nm에서 UV-spectrophotometer를 이용하여 흡광도의 감소로서 측정되었다.

효소의 정량은 standard로써 Bovine Serum Albumin를 이용하여 Bradford method로 측정하였다.

#### 효소의 고정화 방법

1 g의 CNBr-Sepharose 4B 분말을 준비하여(1 g의 동결 건조된 분말은 약 3.5 ml의 젤 생성), 1 mM HCl 200 ml와 혼합한 후 15분간 젤화를 수행하였다. 또한, 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> (pH 8.3)에 0.5 M NaCl을 혼합한 coupling buffer에 효소용액 20 mg을 혼합한후 parafilm으로 덮고, 상온에서 4시간동안 shaker로 회전교반하였다. 교반후 coupling buffer를 이용하여 젤을 세척하고, 잔존하는 active group을 폐쇄하기 위해 0.2 M glycine(pH 8.0) 10 ml에서 젤을 2시간 동안 보관하였다. 0.1 M acetate buffer(pH 4.0)와 0.5 M NaCl 혼합액, 0.1 M Tris-buffer (pH 8.0)와 0.5 M NaCl 혼합액으로 6번 반복 세척하였다.

#### 고정화 효소의 repeated-batch 및 continuous decolorization

Repeated-batch decolorization은 1.5 ml eppendorf tube를 이용하여 shaker로 150 rpm에서 3분 동안 반응 시킨후, 3000 rpm에서 원심분리하여 decolorization을 측정하였고, 반복적으로 80 µM의 RBBR solution(pH 5.0)을 교체하였다. Continuous decolorization은 정량펌프를 사용하여 packed-bed column reactor( 30cm length and 7mm indiameter)에서 실험하였다.

#### 결과 및 고찰

##### 효소의 고정화 효율

10 ml의 laccase용액 22.23 mg을 1 g의 CNBr-activated Sepharose 4B에 고정화 시켰을 때 94%의 고정화 효율을 나타내었다.

### 최적 pH 및 온도

Laccase의 활성과 안정성은 pH 변화에 매우 민감하게 변화하며 효소를 고정화하면 효소의 안정성 및 활성에 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다. Fig.1에 pH변화에 따른 free laccase와 immobilized laccase의 활성도 변화를 나타내었다. free laccase와 immobilized laccase의 최적 활성도의 변화는 없었고, pH 3~7까지는 immobilized laccase가 free laccase에 비해서 다소 활성도의 감소를 나타내지만 pH 2에서는 immobilized laccase가 free laccase보다 더높은 활성도를 나타내는 것은 고정화에 의한 효소의 안정성의 향상에 의한 것으로 보인다. 효소반응에 있어서 온도 또한 매우 중요한 인자로 보고되고 있고, 적정 온도 범위를 벗어난 조건하에서의 효소 반응은 저온의 경우에는 활성이 저하되고, 고온의 경우 단백질 변성으로 활성도가 감소된다. 온도에 따른 활성도 변화를 나타내는 Fig.2는 pH에 따른 활성도의 변화를 나타내는 Fig.1에서와 같이 저온에서는 활성도의 감소를 나타내고, 50. C 이상에서는 안정성 증가로 활성도가 증가하는 것으로 나타났다.

### 효소의 안정성 조건 및 HBT의 영향

Fig.1, 2에서 나타난 결과를 토대로 repeated batch를 통한 효소의 재사용 및 최적 환경을 조사하였다. Fig.3에서는 pH에 따른 효소의 재사용, 안정성 및 활성에 관하여 조사하였다. 20 repeated-batch 결과 pH 4에서 가장 높은 활성을 보이는 반면에 inactivation이 일어났고, pH 5, 6에서는 다소 활성이 떨어지지만 inactivation이 일어나지 않았다. 따라서 연속적인 decolorization위한 조건으로 활성과 안정성 모두를 만족하는 pH 5로 설정하여 실험하였다. 온도에 따른 결과를 살펴볼 때 pH 조건과는 달리 큰 decolorization의 차이는 보이지 않았고, laccase의 최적 온도인 40. C에서 가장 높은 decolorization을 나타내었지만 약 10%정도의 inactivation을 일으켰고, 그로 인한 연속적인 염료의 분해시 불활성으로 30. C가 최적으로 나타났다. laccase의 mediator로 가장 많이 알려진 HBT는 효소의 불활성을 일으킨다는 보고에 의하여 20 repeated-batch의 결과 decolorization을 증가시키는 대신에 약 5%정도의 inactivation을 일으키는 것으로 나타났다.

### 연속적인 염료의 분해

packed-bed column reactor( 30 cm length and 7 mm indiameter)을 이용하여 7 mg의 laccase가 고정화된 젤 1.15 ml, pH 5.0인 100  $\mu$ M의 RBBR을 flow rate 0.5 ml/min의 속도로 연속적인 decolorization시 48시간 동안 70%의 decolorization, 효소 최초의 활성이 89% 유지되었다

## 참고문헌

1. Ryu W. R., Shim S. H., Jang M. Y., Jeon Y. J., Oh K. K., and Cho M. H. ;  
Biodegradation of pentachlorophenol by white rot fungi under ligninolytic and  
nonligninolytic conditions, *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, 5, 211-214. (2000)

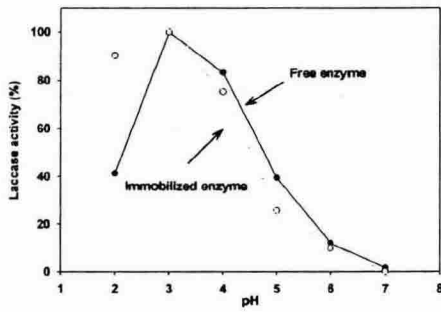


Fig.1 The effect of pH on the activity of free and immobilized laccase

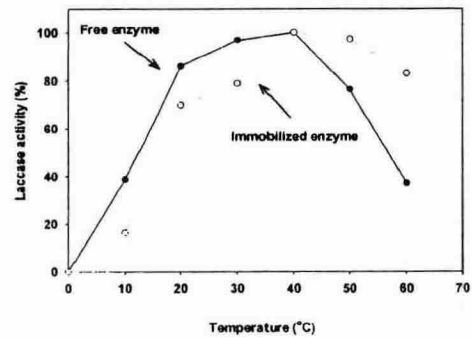


Fig.2 The effect of temperature on the activity of free and immobilized laccase

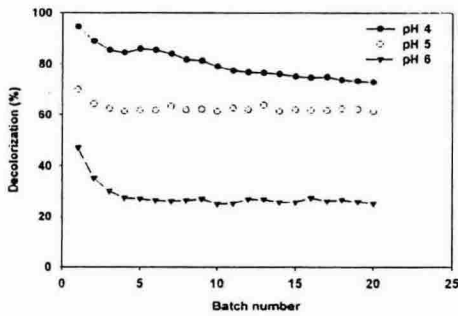


Fig.3 The effect of pH on decolorization of immobilized laccase in repeated-batch

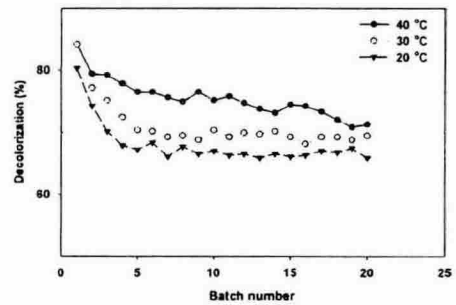


Fig.4 The effect of temperature on decolorization of immobilized laccase in repeated batch

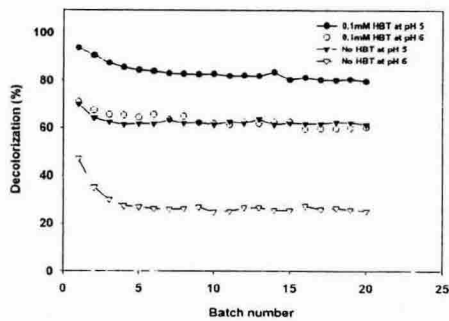


Fig.5 The effect of HBT and pH on decolorization of immobilized laccase in repeated batch

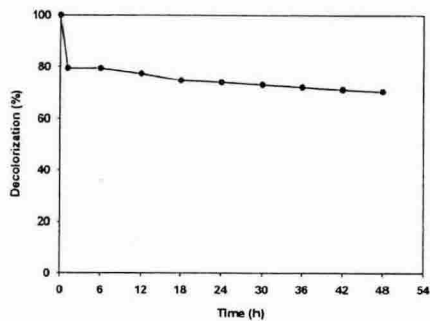


Fig.6 Continuous treatment of 100 μM RBBR through a column (30cm length and 7mm indiameter) containing immobilized laccase