

Remazol Black B의 호기성 탈색을 위한 백색부후균의 분해 특성 분석

이재화¹ · 이은열*

경성대학교 공과대학 식품공학과
¹신라대학교 공과대학 생명공학과

Characterization of Aerobic Decolorization of Remazol Black B by White Rot Fungi

Jae-Hwa Lee¹ and Eun Yeol Lee*

Department of Food Science and Technology, Kyungsung University, Busan 608-736, Korea
¹Department of Bioscience and Biotechnology, Silla University, Busan 617-736, Korea

Abstract

White rot fungi, *Phanerochaete* sp. EJ-31L, was evaluated for its ability to decolorize Remazol Black B, an azo dye that is a widespread pollutant in the wastewater of textile industry. It was observed that extent of decolorization by *Phanerochaete* sp. EJ-31L was dependent on the concentrations of co-carbon and nitrogen source. Effects of agitation and aeration were studied, and agitated culture at aeration condition resulted in greater extent of decolorization than static culture. Remazol Black B was readily decolorized up to 95% within 64 hr by *Phanerochaete* sp. EJ-31L.

Key words – aerobic degradation, azo dye, decolorization, Remazol Black B, white rot fungi

서 론

산업의 발전과 더불어 염색가공 산업도 발전하여, 지금까지 약 100,000종류의 염료가 개발되어 사용되고 있다[6]. 염료는 발색단 등의 화학구조에 따라 azo계, anthraquinone계, indigo계, diphenylmethane 및 triphenylmethane 계 등 매우 다양한 구조를 가진 염료가 개발되어 사용되고 있으며, 일부는 폐수로 유출되어 환경오염 문제를 유발시키고 있다[11]. 국내의 염색폐수 발생업체는 약 1천 500여 개 이상이며, 폐수방류량으로는 전체 폐수방류량의 20%

정도인 약 55만m³의 폐수가 방류되고 있다.

염색 가공중에 염료 사용량의 약 10~15%정도가 폐수로 직접 배출되며, 염료의 복잡한 화학구조 등으로 인한 난분해성 특성 때문에 심각한 환경 문제를 유발시키고 있어 효율적인 처리기술개발이 요구되고 있다. 기존의 물리·화학적 염색 폐수 처리 방법은 신속하게 처리 할 수 있다는 장점이 있지만 고가의 처리 시설 및 운영비용이 높다는 단점이 있으며, 특히 화학적 처리의 경우 화학 약품 사용에 따른 2차 오염 문제가 있다[10]. 생물학적 처리의 경우 미생물의 염료 분해능을 이용하여 궁극적으로 무해한 최종산물로 분해시키는 기술로, 일반적으로 처리 단가가 낮으며, 2차오염물질 발생을 최소화할 수 있다는 장점이 있다[1,5,8]. 곰팡이인 백색부후균 (white rot fungi)은 azo계 염료에

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : 82-51-620-4716, Fax : 82-51-622-4986
E-mail : eylee@star.ks.ac.kr

대해 우수한 탈색 및 생분해능을 가지고 있다[7]. 1990년에 대표적 백색부후균인 *Phanerochaete chrysosporium*을 이용하여 azo 염료를 처리한 결과가 보고된 이후 *Bjerkandera adusta*, *Geotrichum candidum*, *Penicillium* sp., *Phlebia* sp., *Pleurotus oryzae*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Pyricularia oryzae*, *Trametes versicolor* 등 다양한 백색부후균을 이용한 염료 처리 연구결과가 보고되었다[2,9]. 염료와 같은 복잡한 화학 구조를 가진 오염 물질을 처리하는데 있어 박테리아 대비 백색부후균의 장점으로 기질 선택성이 넓어 다양한 종류의 염료를 분해할 수 있으며, 비효율적인 공대사과정 등을 요구하지 않는다[3]. 백색부후균의 염료 분해과정에서는 lignin peroxidase, manganese peroxidase, laccase (benzenediol:oxygen oxidoreductase) 등 lignin 분해 효소들이 중요한 역할을 하며, 전체의 분해대사과정에 대한 분석은 분해 과정의 복잡성으로 인하여 계속적으로 연구가 진행 중이다[4].

본 연구에서는 가장 많이 사용되는 azo계 염료중에서 대표적인 반응성 염료인 Remazol Black B에 대한 탈색능이 우수한 신규 백색부후균인 *Phanerochaete* sp. EJ-31L의 탈색 특성을 평가해 보았다. 보조 탄소원 농도, 질소원, pH 등 분해조건이 염료 탈색에 미치는 영향을 분석하고, 특정 조건에서의 탈색능을 평가해 보았다.

재료 및 방법

Remazol Black B

반응성 염료중 azo계 염료로서 color index number는 20505이며, 분자량은 991.8이다. 발색단으로 두 개의 azo bond (-N=N-)가 있으며, reactive group으로 vinylsulphonyl group [$\text{NaO}_3\text{SO}(\text{CH}_2)_2\text{SO}_2$]을 2개씩 포함하고 있는 검은색의 미세한 입자로 되어 있다.

세포배양 및 염료 탈색율 측정

Remazol Black B 분해에 사용된 *Phanerochaete* sp. EJ-31L의 배양은 0.1 g/L NH_4NO_3 , 1.4 g/L K_2HPO_4 , 0.27 g/L KH_2PO_4 , 0.05 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.02 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.04 g/L NaCl, 0.04 g/L leucine이 들어간 배지에 각종 보조탄소원 또는 염료를 탄소원으로 첨가하여 사용하였다. Remazol Black B 탈색율

은 최소배지 50 ml (300 mL 삼각플라스크)에 다양한 보조 탄소원 및 질소원을 첨가하고, 50 ppm 농도의 염료를 넣은 다음 30°C shaking incubator에서 진탕 배양을 하였다. 일정시간 간격으로 UV-vis spectrometer를 이용하여 600 nm에서 흡광도 변화를 측정하고, 검량곡선을 이용하여 흡광도 감소율을 계산하여 염료 탈색율을 측정하였다.

배양조건이 염료 탈색율에 미치는 영향 분석 실험

Remazol Black B의 탈색율에 영향을 미치는 보조 탄소원의 영향을 알아보기 위하여 0.5%(w/v)의 maltose, galactose, lactose, manitol, sucrose, arabinose, fructose, glucose를 보조 탄소원으로 첨가해 주었다. 염료 탈색능의 항상 결과가 가장 좋은 보조 탄소원을 선별한 후, 보조 탄소원의 농도가 염료 탈색능에 미치는 영향을 알아보기 위하여 농도를 1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 10.0%(w/v)으로 변화시키면서 흡광도 감소율을 분석하였다. 질소원의 영향은 NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, yeast extract, trypton peptone, malto extract, casein을 각각 0.5%(w/v) 농도로 첨가해 주었다. 염료 탈색능 항상 결과가 가장 좋은 질소원을 선별한 후 질소원의 농도가 염료 탈색능에 미치는 영향을 알아보기 위하여 농도를 0.05, 0.1, 0.2%(w/v)으로 변화시키면서 흡광도 감소율을 분석하였다.

배지 pH의 영향은 5.5, 6.5, 7.5, 8.5, 9.5로 변화시키면서 염료 탈색율을 측정하여 최적 pH를 결정하였다. 혐기적 조건에서의 염료 탈색능은 35ml의 serum bottle에 배지를 넣은 후 99.9% 순도의 질소 가스로 5분간 충전 시켜 bottle 내를 혐기성 조건으로 만든 다음, 미생물을 접종하고 일정 시간 간격으로 주사기를 사용하여 시료를 1ml씩 채취하여 탈색율을 측정하였다.

결과 및 고찰

보조탄소원 첨가가 탈색율에 미치는 영향

본 실험에 사용한 *Phanerochaete* sp. EJ-31L 균주는 염색 공단 폐수로부터 염료분해능이 우수한 미생물 균집을 농화 배양하여 분리 동정한 백색부후균이다. 일반적으로 미생물을 이용한 염료 분해 및 탈색에 있어서 박테리아를 사용하는 것 보다 백색부후균은 이용하는 경우 염료분해에 이용되는 효소들의 기질 특이성이 넓어 다양한 종류의 염료 분

해에 활용될 수 있으며, 고농도 염료 독성에 대한 저항성도 높다는 장점도 기대할 수 있다.

Phanerochaete sp. EJ-31L의 염료 탈색능을 평가하고 회분식 탈색반응 특성을 분석하기 위하여 보조 탄소원이 염료 탈색능에 미치는 영향을 분석하였다. 보조탄소원을 첨가하지 않은 플라스크를 대조군으로 하여 maltose, galactose, lactose, manitol, sucrose, arabinose, fructose, glucose 등의 보조탄소원을 0.5%(w/v) 농도로 첨가하고 탈색을 변화를 측정하였다. 24 시간 incubation한 결과, 보조탄소원을 첨가해준 모든 경우에서 대조군에 비해 탈색 정도가 4~5배 정도 향상된 것을 관찰 할 수 있었다. 이러한 결과들로부터 적절한 보조탄소원이 제공되는 경우 세포 성장 및 대사효율의 증대로 인하여 염료 탈색능이 향상되는 것으로 판단된다. Remazol Black B 탈색능 향상 결과가 좋으면서 가장 저렴한 sucrose에 대하여 보조탄소원 농도 변화가 탈색율에 미치는 영향을 알아보기 위해 각각 1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 10.0% (w/v)의 농도로 첨가하고 탈색율을 측정하였다. Fig. 1과 같이 약 52 hr 경과후 탈색 결과를 살펴보면, 보조탄소원이 2~5%(w/v) 농도로 첨가된 경우에는 83% 정도의 높은 탈색율을 얻을 수 있었으며, 1%(w/v)와 10%(w/v) 농도로 첨가된 경우보다 약 10% 이상의 탈색효율이 향상된 결과를 얻을 수 있었다 (Fig. 1).

질소원 첨가의 영향

보조탄소원으로 3%(w/v)의 sucrose를 첨가한 배지에 질

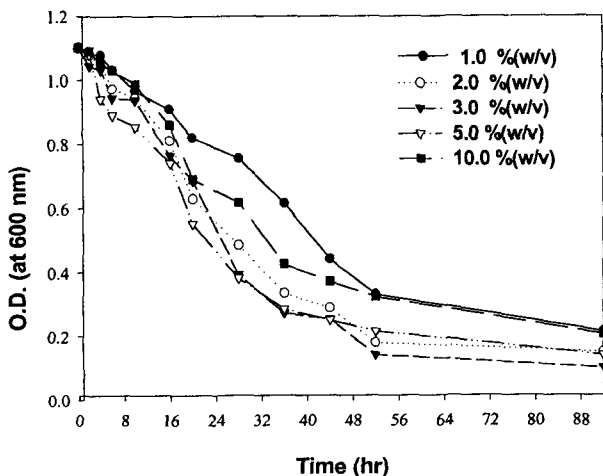


Fig. 1. Effects of various sucrose concentrations on decolorization of Remazol Black B.

소원을 첨가하지 않은 경우를 대조군으로 하고 질소원으로 NH₄Cl, (NH₄)₂SO₄, yeast extract, trypton peptone, malto extract, casein 등을 질소원으로 각각 0.5%(w/v) 농도로 첨가하고 탈색율을 측정하였다. NH₄Cl, (NH₄)₂SO₄를 질소원으로 첨가한 경우에는 대조군에 비해 2배 정도의 탈색율 향상을 볼 수 있었으나, casein, malto extract, trypton peptone, yeast extract 등을 첨가한 경우에는 오히려 탈색율이 저하되는 결과를 얻을 수 있었다. 이것은 보조탄소원 및 복합 질소원 등이 제공되어 좋은 세포성장 조건이 되는 경우, 균주들은 염료 분해보다는 세포성장 자체에 주안점을 둔 대사과정을 운영한 것으로 판단된다. Remazol Black B 탈색능 향상 결과가 좋은 (NH₄)₂SO₄를 각각 0.05, 0.1, 0.2%(w/v)의 농도로 제공하고, 탈색율을 측정하였다. 초기 6 시간까지는 탈색정도가 8~11%로 거의 비슷한 반면, 48 시간 경과 이후에는 0.05%(w/v)의 농도에서 85% 수준의 탈색율을 보여 주었다. (NH₄)₂SO₄ 농도가 0.1% (w/v)에서 0.2%(w/v)로 높아질수록 탈색효율이 저하되는 결과를 보여주어 질소원이 고농도로 첨가 될수록 탈색율은 저하됨을 알 수 있었다(Fig. 2).

최적 pH 결정 및 혐기적 조건, 배양 조건에 따른 탈색능 평가

Remazol Black B 탈색이 가장 잘 되는 최적 pH를 알아보기 위하여 3%(w/v)의 sucrose, 0.05%(w/v)의 (NH₄)₂SO₄를 넣어준 배지의 pH를 각각 5.5, 6.5, 7.5, 8.5, 9.5로 변화시키면서 탈색율을 측정하였다. 측정결과 pH 6.5에서 가장

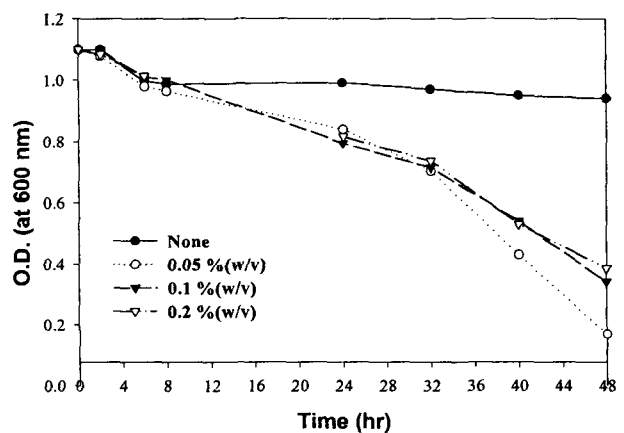


Fig. 2. Effects of various (NH₄)₂SO₄ concentrations on decolorization of Remazol Black B.

좋은 탈색율을 보여 *Phanerochaete* sp. EJ-31L은 중성에서 염료 탈색능이 우수한 것을 알 수 있었다 (data not shown).

혐기적인 조건에서의 Remazol Black B에 대한 *Phanerochaete* sp. EJ-31L의 탈색능 평가를 위하여 보조탄소원 및 질소원을 첨가한 배지를 serum bottle에 넣고, 99.9% 순도의 질소 가스로 5분 이상 충전시켜 혐기적 조건으로 만든 다음 *Phanerochaete* sp. EJ-31L을 접종하고 일정 시간 간격으로 실린지를 이용하여 1 ml의 시료를 채취하여 탈색율을 측정하였다. 혐기적 조건의 경우 대조군인 호기적 상태에서의 탈색율에 비해 46% 수준의 초기 탈색 속도를 보였으며, 60 시간 경과 이후에는 호기적 조건에 비해서 27% 수준의 탈색 효율을 보여 혐기적 조건에서는 현저한 탈색을 저하가 관찰 되었다. 따라서, *Phanerochaete* sp. EJ-31L는 호기적 조건에서 Remazol Black B의 탈색능이 우수한 균주임을 알 수 있었다 (data not shown).

배양 조건에 따른 *Phanerochaete* sp. EJ-31L의 탈색능을 알아보기 위해서 최종 염료 농도가 50 ppm인 배양액을 30°C incubator에서 정지 배양을, 30°C shaking incubator에서 진탕 배양을 각각 실시하였다. Remazol Black B 탈색율은 8 시간 이전까지는 정지배양 및 진탕 배양에서 비슷한 탈색율을 보였으나, 48 시간 이후에는 진탕배양에서의 탈색율이 정지배양 대비 2배이상 높은 것을 알 수 있었다 (Fig. 3)

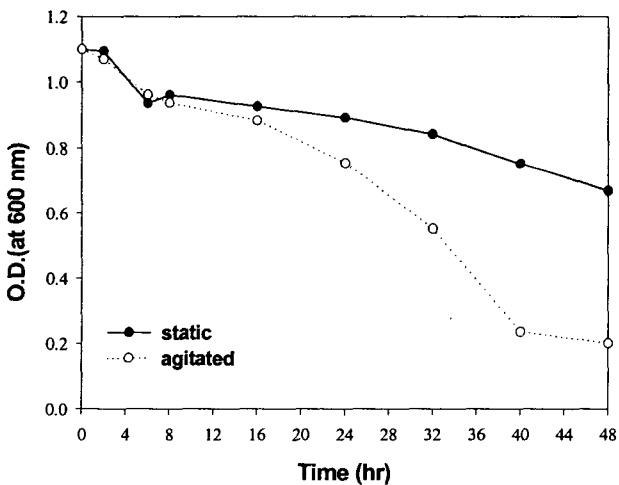


Fig. 3. Comparison of dye decolorization by agitated and static cultures of *Phanerochaete* sp. EJ-31L.

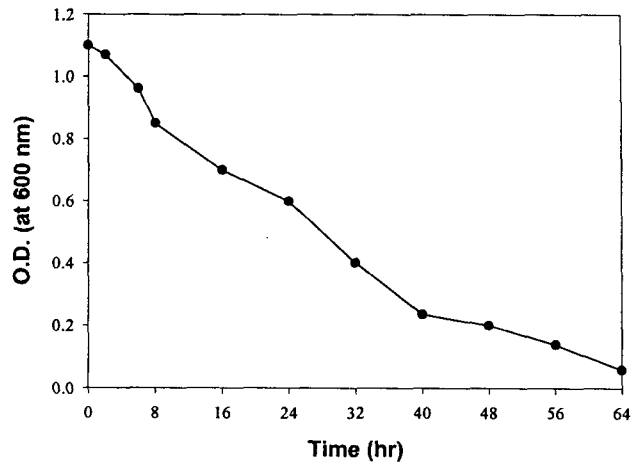


Fig. 4. Batch decolorization of waste water containing Remazol Black B by *Phanerochaete* sp. EJ-31L.

Phanerochaete sp. EJ-31L에 의한 Remazol Black B의 회분식 탈색 동력학

Azo계 염료 오염도가 높은 염색공단 폐수로부터 분리한 백색부후균인 *Phanerochaete* sp. EJ-31L에 의한 Remazol Black B에 대한 회분식 탈색능을 평가해 보았다. Sucrose 3%(w/v), 0.05%(w/v)의 $(NH_4)_2SO_4$ 를 첨가한 배지에서 pH 및 온도를 각각 6.5, 30°C로 하고 Remazol Black B 초기 농도 50 ppm에서 진탕 배양을 통해 탈색능을 분석하였다. Fig. 4와 같이 일정 시간 간격으로 OD값을 측정해 본 결과 40 시간 이후에는 약 78%의 탈색율을 보였고, 64 시간 경과시 약 95% 이상의 탈색율을 보여주었다. 유사한 회분식 분해조건에서 다른 종류의 미생물들을 이용하여 95% 이상의 탈색율에 도달하기 위하여 보통 수일이 소요된 기존 결과들과 비교하여 *Phanerochaete* sp. EJ-31L의 우수한 탈색능을 확인할 수 있었으며, 향후 azo계 염료 처리용 실험도 생물공정에서도 백색부후균인 *Phanerochaete* sp. EJ-31L을 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

요 약

대표적인 azo계 반응성 염료인 Remazol Black B에 대한 탈색능이 우수한 신규 백색부후균인 *Phanerochaete* sp. EJ-31L의 탈색 특성을 평가해 보았다. 보조 탄소원 농도, 질소원, pH 등의 배양조건이 염료 탈색율에 미치는 영향을 분석한 결과, 3%(w/v)의 sucrose, 0.05%(w/v)의 $(NH_4)_2SO_4$

를 첨가한 배지에서 pH 6.5의 조건에서 탈색능이 우수하였다. 혐기적 조건에서는 호기적 조건 대비 27% 수준의 탈색 효율을 보였으며, 진탕배양에서의 탈색율이 정지배양 대비 2배이상 높아 *Phanerochaete* sp. EJ-31L은 호기적 조건에서 탈색능이 우수함을 알 수 있었다. 초기 Remazol Black B 농도 50 ppm에 대한 회분식 처리시 약 95% 이상의 탈색율을 보여 향후 azo계 염료 처리용 생물공정에 백색부후균인 *Phanerochaete* sp. EJ-31L을 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

참 고 문 헌

- Banat, I. M., P. Nigam, D. Singh and R. Marchant. 1996. Microbial decolorization of textile-dye-containing effluents: a review. *Biores. Technol.* **58**, 217-227.
- Cripps, C., J. A. Bumpus and S. C. Aust. 1990. Biodegradation of azo and heterocyclic dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 1666-1671.
- Field, J. A. E. De Jong, G. Feijoo-Costa and J. A. M. DeBont. 1993. Screening for ligninolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotics. *Trends Biotechnol.* **11**, 44-48.
- Kirby, N., R. Marchant, and G. McMullan. 2000. Decolourisation of synthetic textile dyes by *Phlebia tremellosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* **188**, 93-96.
- Meyer, U. 1981. Biodegradation of synthetic organic colorants, pp. 371-385, In Leisinger, T., A. M. Cook, R. Hutter and J. Nuesch (eds.), *Microbial degradation of xenobiotic and recalcitrant compounds*, FEMS Symposium **12**, Academic Press Inc., London.
- O'Neill, C., F. R. Hawkes, D. L. Hawkes, N. D. Lourenco, H. M. Pinheiro W. Delee. 1999. Colour in textile effluents-sources, measurement, discharge consents and simulation: a review. *J. ChemTechnol. Biotechnol.* **74**, 1009-1018.
- Reddy, C. A. 1995. The potential for white-rot fungi in the treatment of pollutants. *Curr. Opin. Biotechnol.* **6**, 320-328.
- Stolz, A. 2001. Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**, 69-80.
- Swamy, J. and J. A. Ramsay. 1999. The evaluation of white rot fungi in the decoloration of textile dyes. *Enzyme Microbial Technol.* **24**, 130-137.
- Yeh, R. Y. L. and A. Thomas. 1995. Color difference measurement and color removal from dye wastewaters using difference adsorbents. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **63**, 55-59
- Zollinger, H. 1987. *Colour chemistry - synthesis, properties and applications of organic dyes and pigments*. pp. 92-100, VCH, New York.

(Received July 29, 2003; Accepted August 16, 2003)