

*Pseudomonas*속의 균주를 이용한 Azo계와 Reactive계의 Dye의 생분해

이 제 혁 · *황 규 대 · **조 동 욱 · 전 억 한

경희대학교 산업대학 식품가공학과

*자연과학대학 환경학과

**한국식품개발연구원

Biodegradation of Azo and Reactive Dyes with *Pseudomonas* strains

Je-Hyuk Lee, *Gyu-Dae Whang, **Dong-Wook Cho and Uck-Han Chun

Department of Food Technology and Science, College of Industry

*Department of Environmental Science, College of Natural Science

Kyung-Hee University, Suwon 449-701, Korea

**Korea Food Research Institute

ABSTRACT

This study describes biodegradation of dyes which are used in textile industries. Dyes released into the environment from industrial waste water are considered to be a serious pollution problem because of the wide spread into environment with a variety of colors. The microorganisms used in this experiment were *Pseudomonas* species which had been screened from aeration tank of waste water treatment. It was found that optimum concentrations for culture media were 14g of glucose, 6g of peptone, 160mg of Na_2HPO_4 , 200mg of KCl, 140mg of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.0g of KH_2PO_4 , 400mg of NaCl, 200mg of CaCl_2 and dye 10ppm per litre of distilled water. The high efficiency of dye degradation was obtained at pH 7-8 and 30-35°C. Strains screened are excellent for removal of azo and reactive dyes which are relatively stable and difficult to degrade. Dyes of 10ppm such as mono-azo(Lot No. 180), di-azo(Lot No. 138) and reactive red(Lot No. 2) were mostly decolorized within 2 days and di-azo(Lot No. 151) and reactive red(Lot No. 34, No. 00166) were decolorized within 5 days in the controlled fermenter. In the case of reactive dyes, oxygen supply showed lower biodegradability compared to anaerobic culture.

서 론

염색공정에서 사용되고 있는 dye의 화학적 조성은 매우 다양하다(1). 염색공업의 발달에 따른 dye의 개량으로 현재 사용되고 있는 dye는 화학적으로 매우 안정하여, 따라서 종래의 폐수처리 방법으로는 거의 제거되지 않고 그대로 배출되고 있는 실정이며(2, 3), 또한 생물학적 독성을 나타내는 물질이고 인체에 암을 유발시킨다는 보고도 있다(4, 5). 따라서,

제거되지 않고 배출된 dye는 공공수역이나 식수원의 오염물질로서 작용하여 생태계를 형성하는 생체에 심각한 저해영향이 예상된다.

염색공업에서 가장 보편적으로 사용되는 dye의 종류는 Azo계와 reactive red계의 색소이다. 이러한 색소들은 현재의 폐수처리공정에서 처리되지 않고 배출되어 나오는 dye중의 대부분을 차지하고 있다. 이 dye들은 현재 난분해성 물질로 알려져 있으나, Yatome 등(6, 7, 8)에 의해 하수의 토양에서 분해능

을 가진 미생물이 분리되었으며, 또한 분리된 미생물에 의한 여러 종류의 dye의 분해도가 조사되었다.

염색공정에서 배출되는 dye의 제거를 위하여 대부분의 폐수처리공정에서는 물리학적, 화학적 처리공정을 이용하고 있으나 처리비용이 매우 비싸며 이차오염물질인 폐기물의 발생으로 인하여 경제적이고 효율적인 처리공정개발이 요구된다. 이러한 효율적인 처리공정개발을 위해서는 난분해성 dye의 분해능을 가진 미생물의 분리, 미생물의 생물학적 특성 조사, 폐수의 성상과 미생물의 생물학적 특성을 이용한 공정개발 등이 이루어져야 한다.

본 실험에 사용된 azo계 dye의 화학구조상의 특징은 azo기를 주체로 한 직선상의 구조를 갖고, 또한 수용성을 부여하기 위해 sulfon산기(-SO₃Na)를 갖는다. 반응성 염료(reactive dye)는 cellulose의 -OH기와 화학반응에 의해 결합할 수 있는 구조(Fig. 1)를 가지고 있다(9).

최근의 연구결과에 따르면, 미생물에 의한 dye의 분해가 영양소의 제한조건하에서 lignin분해 system에 의해 일어난다고 한다(10, 11). dye 분해능이 있는 fungi의 경우 lignin분해 system이 주로 ligninase나 lignin peroxidase에 의해 구성되어진다. 또한 *Pseudomonas*속의 경우는 azoreductase에 의해 dye 분해가 이루어진다(12).

미생물을 이용한 dye 분해에 관한 현재까지의 연구는 주로 azo dye의 분해도를 측정하고, BOD·COD와 분해도와와의 관계, 고정화 세포를 이용한 dye

의 분해, 분자량과 분해도와와의 관계 등에 대해 이루어졌다(6, 7, 8).

Toshihiko Ogawa 등(6, 7, 8, 13)은 여러 조건에서 Azo계 dye의 분해에 대해 연구하였으나, 산소공급이 dye 분해에 미치는 영향과 reactive계 dye 분해에 대한 연구가 수행되지 않았는 바, 본 연구에서는 난분해성 색소(reactive계)를 분해할 수 있는 균주를 염색공장 폐수처리장의 폭기조에서 분리하였으며, 이 분리된 미생물의 dye 분해 특성 및 최적 배양조건과 산소공급이 미생물의 dye 분해도를 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

Dye 분해균주의 분리

Dye 분해균을 자연계로부터 분리하기 위하여 염색공단 폐수처리장의 폭기조에서 채취한 폐수를 시료로 사용하였다. 우선 시료중의 미생물들을 peptone 6.0g/L, glucose 14.0g/L, Na₂HPO₄ 160mg/L, KCl 200mg/L, MgSO₄ · 7H₂O 140mg/L, KH₂PO₄ 1.0g/L, NaCl 400mg/L, CaCl₂ 200mg/L를 함유한 agar media에 백금으로 streaking하여 배양하였다(13). 여기서 배양된 colony를 3번 더 같은 배지에 streaking하여 순수배양하였다. 이 미생물중 dye 분해균주를 분리하기 위하여, 이 미생물들을 위의 배지조성에 azo계 dye 3종류와 reactive red계 dye 3종류가 각각 함유된 액체배지에서 배양시켜 배지의 색을 가장 많이 탈색시키는 미생물만을 1가지씩 선별하였다.

사용된 dye

실험에 사용된 dye는 염색공정에서 많이 사용되는 azo계 3종류와 reactive red계 3종류이며 안양에 위치한 염색공장에서부터 구하여 사용하였다. 각 dye의 상품명은 Table 1과 같다.

Dye의 분석

Dye의 농도측정은 dye의 농도, 즉 ppm과 UV-spectrophotometer에 의한 absorbance와의 관계를 이용하여 조사하였다. 각 dye의 absorbance를 측정하기 위하여 UV-spectrophotometer에서 사용된 파장은 300-700nm의 파장중에서 가장 높은 absorbance가 나타나는 파장을 사용하였다.

배양액중의 dye의 분해도는 그 특정파장에서 dye의 absorbance를 측정하여 그 수치의 감소로 판단

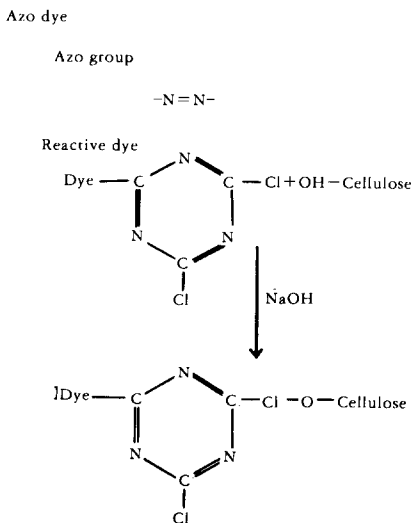


Fig. 1. Characteristics of azo and reactive dyes.

Table 1. Dyes used for biodegradation.

분 류	상 품 명	비 고
Mono-azo	Acid Brill. Red 3BL.	Lot No. 180
Di-azo	Apollo Nylon Fast Red S2B.	Lot No. 138
Di-azo	Nylon Fast Red M-PG.	Lot No. 151
Reactive red	Apollocion Red H-E7B.	Lot No. 2
Reactive red	Apollofix Red SF-3B.	Lot No. 34
Reactive rdd	Apollocion Red H-E3B.	Lot No. 00166

하였다. Fig. 3은 spectrophotometer absorbance와 dye의 농도(ppm)과의 관계를 나타낸다. Dye의 분석방법은 sample을 취한 후, 10,000rpm에서 10분 동안 원심분리하여 상층액의 absorbance를 측정하여 시행하였다(8).

회분배양

선별된 미생물 각각의 최적 pH를 조사하기 위하여 K_2HPO_4 , KH_2PO_4 로 완충용액을 제조하여 pH 5, pH 6, pH 7, pH 7.5, pH 8의 배지를 만든 다음, 교반없이 30°C에서 5일간 배양하였다. 이에 사용한 배지조성은 Table 2와 같다. 채취한 시료는 UV-spectrophotometer를 사용하여 660nm에서 O. D.(Optical Density)를 측정하여 미생물의 성장을 판단하였으며, dye의 absorbance를 측정하여 그 분해도를 조사하였다.

또한, 최적온도를 조사하기 위하여 최적 pH로 고정시킨 후 온도를 25°C, 30°C, 35°C, 40°C로 달리하여 교반없이 5일간 배양하여 최적온도를 조사하였다.

Dye의 분해도는 처음의 dye의 O. D.에서 시료물의 O. D.를 뺀 값에 대한 최종 분해된 dye의 O. D.값의 비로 나타내었다.

산소 공급에 따른 미생물의 성장과 dye의 분해도에 미치는 영향을 알아보기 위하여 Jar fermentor (New Brunswick Model Bioflo IIC)를 사용하여 실험을 행하였다.

먼저 산소를 일정농도로 공급하기 위하여 fermenter의 D. O probe를 연결시키지 않은 상태에서 D. O를 0으로 고정시키고, D. O probe를 연결시키고 산소공급을 시킨 상태에서 500rpm으로 30분간 agitation시킨 후 D. O가 변하지 않을 때의 수치를 100으로 고정한 뒤, agitation speed를 조절하여 D. O를 50으로 유지시키며 실험을 수행하였다. 다음은 산소의 공급없이 agitation speed만을 150으로 유지시켜 2일간 실험하였다.

Table 2. Composition of batch culture medium.

Component	Content(g/L)
glucose	14.0
peptone	6.0
NH_2HPO_4	0.16
KCl	0.2
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.14
KH_2PO_4	1.0
NaCl	0.4
$CaCl_2$	0.2
dye	10ppm

결과 및 고찰

Dye 분해균주의 분리

염색공단의 폐수처리장의 폭기조에서 채취한 시료로부터 순수배양된 미생물중, Azo계 dye 3종류와 reactive red계 dye 3종류를 각각 잘 탈색시키는 미생물만을 1가지씩 선별하였다. 이 6종류의 미생물들은 dye의 분해능과 현미경상의 형태(간균상) 등으로 *Pseudomonas*속인 것으로 추정되어 Table 3과 같이 구분하여 표기하였다.

Table 3. *Pseudomonas strians* selected from the plates containing various dyes.

Strains	Dyes used for selection
<i>Pseudomonas</i> sp1	Mono-azo(No. 180)
<i>Pseudomonas</i> sp2	Di-azo(No. 138)
<i>Pseudomonas</i> sp3	Di-azo(No. 151)
<i>Pseudomonas</i> sp4	Reactive red(No. 2)
<i>Pseudomonas</i> sp5	Reactive red(No. 34)
<i>Pseudomonas</i> sp6	Reactive red(No. 00166)

파장에 따른 각 dye의 특징

UV-spectrophotometer를 사용하여 각 dye의 absorbance를 300-700nm의 파장범위내에서 scanning하였다. Fig. 2를 보면, 각 dye의 peak가 나타나는 파장이 다른데, 그 특정파장은 Table 4와 같다. 각 dye의 특정파장에서 dye의 농도를 따른 absorbance를 측정하여 Fig. 3과 같은 표준곡선을 얻었다.

시료중의 dye의 농도는 UV-spectrophotometer로 시료중의 dye의 absorbance를 측정한 후 Fig. 3의 표준곡선을 이용하여 얻을 수 있었다.

Table 4. Wavelength(nm) at which the highest peaks occurred for each dye.

dyes	Wavelength(nm)
Mono-azo(No. 180)	554
Di-azo(No. 138)	532
Di-azo(No. 151)	510
Reactive red(No. 2)	542
Reactive red(No. 34)	542
Reactive red(No. 00166)	536

dye의 분해도를 조사하기 위하여 pH가 다른 배지를 제조하여 실험을 수행한 결과, *Pseudomonas* sp 1, 2, 3, 4, 5, 6의 최대의 비증식 속도는 pH 7-8에서 나타났다(Table 5). 이 pH범위에서의 dye의 분해도는 mono-azo(Lot No. 180), di-azo(Lot No. 138), reactive red(Lot No. 2)의 경우는 매우 높았으나, di-azo(Lot No. 151), reactive red(Lot No. 34), reactive red(Lot No. 00166)의 경우는 그 분해도가 대체적으로 낮았다.

배양액중의 dye의 농도가 dye의 초기농도의 반으로 감소되는데 걸리는 시간, 즉 반감기(Half-decolorization time) 역시 pH 7-8에서 대체적으로 짧았으며, 이는 dye의 분해속도가 높음을 의미한다(6). 분해력이 높은 *Pseudomonas* sp 1, 2, 4는 반감기가 약 5, 8, 6시간으로 dye의 분해속도가 높음을 보여주고 있다.

온도의 영향에 따른 dye의 분해

선별된 미생물들의 온도에 따른 성장과 dye의 분해도를 조사하기 위해서 pH를 7.5로 고정시킨 후 온도를 25℃, 30℃, 35℃, 40℃로 달리하여 미생물을 배양시키고 배양액중의 dye의 농도를 분석한 결과, 6가지 종류의 *Pseudomonas* sp 1, 2, 3, 4, 5, 6 모두 최적 온도가 30℃~35℃였다(Table 6). 각 미생물은 25℃에서는 어느 정도 균체의 성장과 dye의 분해가 일어났지만, 40℃의 경우는 균체의 성장이 낮았으며, dye의 분해도가 극히 낮았다.

Table 5의 온도에 의한 dye 분해도의 결과와 유사하게, pH를 달리했을 경우의 분해도 역시 선별된 각 미생물에 의해서 mono-azo(Lot No. 180), di-azo(Lot No. 138), reactive red(Lot No. 2)의 경우는 분해도가 높았고, di-azo(Lot No. 151), reactive red(Lot No. 34), reactive red(Lot No. 00166)의 경우는 분해도가 낮았으며, 반감기도 유사한 결과

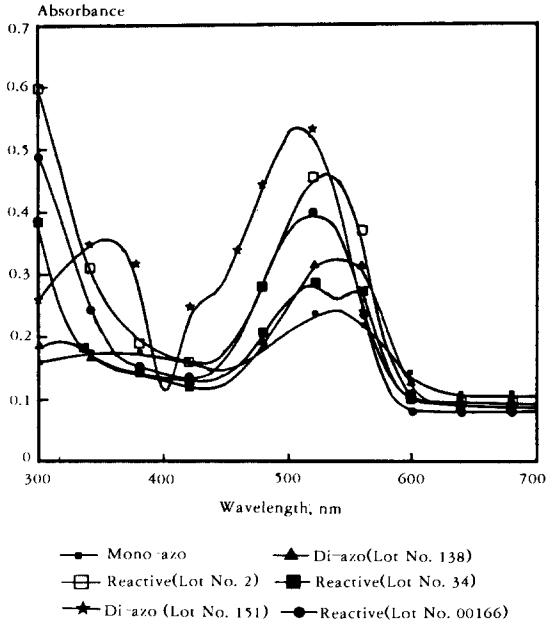


Fig. 2. Scanning curve of azo and reactive dyes.

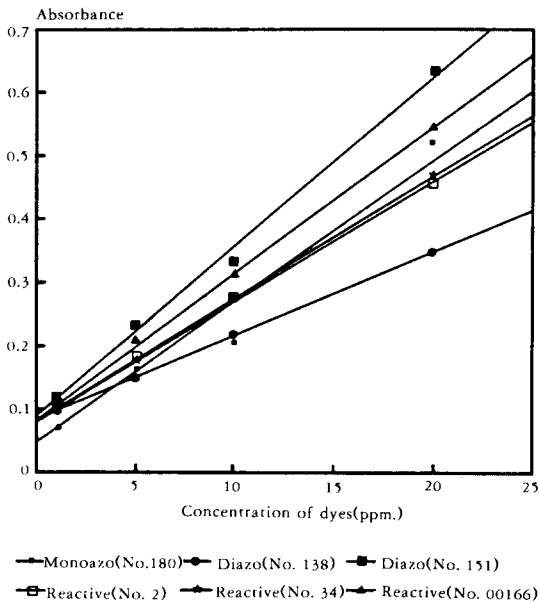


Fig. 3. O. D. vs. Dye concentration.

pH의 영향에 따른 dye의 분해

선별된 6가지 종류의 미생물의 pH에 따른 성장과

Table 5. Effect of pH on degradability of dyes.

Strain (dye)	μ (h ⁻¹)					분해도(%)					반감기(h)				
	pH 5	pH 6	pH 7	pH 7.5	pH 8	pH 5	pH 6	pH 7	pH 7.5	pH 8	pH 5	pH 6	pH 7	pH 7.5	pH 8
<i>P. sp 1</i> (Momo-azo No. 180)	0.393	0.65	0.69	0.446	0.67	61.7	89.5	96.7	92.8	90.4	44.1	12.3	6.1	5.1	8.2
<i>P. sp 2</i> (Di-azo No. 138)	0.342	0.102	0.416	0.234	0.273	77.6	93.5	83.7	95.2	98.3	24.6	11.8	10.2	8.2	14.3
<i>P. sp 3</i> (Di-azo No. 151)	0.144	0.111	0.15	0.493	0.313	24.3	49.8	48.2	53.6	49.3	14.3	56.4	30.7	13.3	8.2
<i>P. sp 4</i> (Reactive No. 2)	0.137	0.168	0.313	0.493	0.347	14.6	17.9	4.8	18.3	31.3	9.5	12	13	11	6
<i>P. sp 5</i> (Reactive No. 34)	0.161	0.205	0.255	0.171	0.236	3.1	15.2	24.9	0.3	6.4	3	8.5	12	5	3
<i>P. sp 6</i> (Reactive No. 00166)	0.129	0.235	0.187	0.499	0.173	3.7	15	9.8	10.2	16	7	5.5	7.5	6	3.5

Table 6. Effect of various temperatures on the degradability of dyes.

Strain (dye)	μ (h ⁻¹)				분해도(%)				반감기(h)			
	25°C	30°C	35°C	40°C	25°C	30°C	35°C	40°C	25°C	30°C	35°C	40°C
<i>P. sp 1</i> (Momo-azo No. 180)	0.024	0.417	0.2	0.2	6.3	92.8	38.2	49.7	2	5.1	10.7	6.1
<i>P. sp 2</i> (Di-azo No. 138)	0.189	0.245	0.39	0.244	8.18	95.2	13.3	70	4.1	6.1	5.1	11.3
<i>P. sp 3</i> (Di-azo No. 151)	0.184	0.438	0.355	0.227	30.3	53.6	34.4	24.4	7.7	12.8	22	13.3
<i>P. sp 4</i> (Reactive No. 2)	0.115	0.499	0.212	0.293	11.2	18.3	18.9	0.56	7.7	3.6	10.2	49.2
<i>P. sp 5</i> (Reactive No. 34)	0.057	0.172	0.229	0.114	19.1	0.3	20.5	21.9	4.6	4.1	3	36.9
<i>P. sp 6</i> (Reactive No. 00166)	0.037	0.483	0.219	0.025	6.1	10.2	12.7	4.2	10.7	7.1	2.5	8.4

를 보였다. Toshihiko Ogawa 등(8)은 flask culture로 *Pseudomonas cepacia* 13NA를 사용하여 azo계 dye를 분해하였을 때, 최적의 분해도를 나타내는 pH는 7~7.5이고, pH 4.3~4.1에서는 분해도가 매우 낮고 최적조건에서 dye의 분해도는 약 90%라고 보고하였다.

산소 공급에 따른 dye 분해

산소 공급에 따른 영향을 알아보기 위하여 fermenter를 사용하여 D. O를 50%로 유지시켰을 때와 aeration하지 않고 agitation speed만을 150으로 유지시켜 배양하였을 때의 세포성장과 dye 분해도를 Fig. 4에 나타내었으며, 이에 사용된 균주는 *Pseudomonas* sp. 4였다.

Fig. 4에서 보는 바와 같이, D. O를 control로 하였을 경우가 50%로 유지시켰을 경우보다 세포성장은 낮았으나, dye의 분해도는 훨씬 높았다. 이 결과로 dye 분해 mechanism이 산소의 공급에 의해 저해받는다고 생각되며, 균체량이 dye 분해에 미치는 영향보다 산소와 같은 환경적 조건에 따라 dye 분해가 훨씬 더 영향을 받는다고 생각된다.

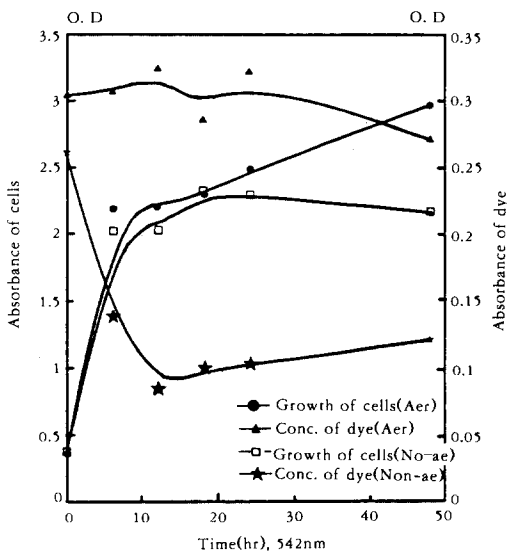


Fig. 4. Cell growth and degradability of dyes with *Pseudomonas* sp. 4 in the batch culture with aeration non-aeration.

요 약

난분해성인 색소를 대분해할 수 있는 미생물을 분리하여, 색소분해의 최적조건을 조사하였다. 미생물은 폐수처리공장의 폭기조에서 채취한 폐수로부터 agar media에서 순수분리하였다. 이 균주들을 glucose, peptone, Na_2HPO_4 , KCl, MgSO_4 , KH_2PO_4 , NaCl, CaCl_2 와 dye(azo계, reactive red계) 10ppm을 함유한 액체 배지에서 dye의 분해력이 강하였으며, 이때의 최적 pH는 중성 또는 약알칼리성이고, 최적 온도는 30°C 전후이다. 이 조건에서 10ppm의 mono-azo(Lot No. 180), di-azo(Lot No. 138), reactive red(Lot No. 2)는 약 2일에 거의 분해되었고, di-azo(Lot No. 151), reactive red(Lot No. 34, Lot No. 00166)는 약 5일에 거의 분해되었고, 최적 배지조건하에서 산소의 영향은 D. O를 50%로 유지시켰을 경우보다 혐기성 배양의 경우가 reactive dye(Lot No. 2)의 분해도가 훨씬 높았다.

참고문헌

1. Schanbron(1986), *Biotechnology*, VCH Weinheim, Vol 8, 496.
2. R. Anliker(1979), *Ecotoxicol. Environ. suf.* **3**, 59.
3. G. B. Michael and D. L. Lewis(1985), *Environ. Toxicol. Chem.* **4**, 45.
4. U. Meyer(1981), *FEMS/Symp.* **12**, 371.
5. T. Leisinger and W. Brunner(1986), *Biotechnology*, Weinheim, Federal Republic of Germany, Vol 8, 497.
6. Y. Yatome, T. Ogawa and E. Idaka(1981), *J. of Soc. Dyers Colour*, **97**, 166.
7. T. Ogawa, Y. Yatome and E. Idaka(1981), *J. of Soc. Dyers Colour*, **97**, 435.
8. T. Ogawa, Y. Yatome and E. Idaka(1986), *J. of Soc. Dyers Colour*, **102**, 12.
9. 김경환, 배옥희(1992), *염색학* 7판, P. 23, 형설출판사.
10. C. Cripps, A. B. John and D. A. Steven(1990), *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 1114.
11. M. Tien and T. K. Kirk(1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 2280.
12. T. Zimmerman, H. G. Kulla and T. Leisinger(1982), *Eur. J. Biochem.* **129**, 197.
13. T. Ogawa, E. Idaka and Y. Yamada(1974), *SEN-igakkaiishi*, **30**, 517.