

Trametes sp. CJ-105에 의한 염료의 색도제거

김현수* · 오광근 · 이철우 · 이재홍 · 전영중
제일제당(주) 종합연구소

Decolorization of Dyes by *Trametes* sp. CJ-105. Hyun-Soo Kim*, Kwang-Keun Oh, Cheol-Woo Lee, Jae-Heung Lee and Yeong-Joong Jeon. R&D Center, CHEILJEDANG Corporation, Ichon 467-810, Korea - Decolorization of congo red, methyl orange, poly R-478, remazol brilliant blue R and crystal violet by white-rot fungus *Trametes* sp. CJ-105, isolated in Korea, was investigated. Remazol blue and methyl orange were almost completely decolorized after 2 days of culture, but congo red, crystal violet and poly R-478 were decolorized by about 80%, 40% and 30% after 10 days of culture, respectively. As a result of determination of cell mass and enzyme activity, it was shown that color removal efficiency was related to cell mass and enzyme activity, and also found that only laccase (E.C.1.10.3.2) activity was existed in the culture broth. The decolorization ratios of remazol blue in the concentrations of 100 ppm to 3,000 ppm were 85% and above after 2 days of culture. In this study, we found that white-rot fungus, *Trametes* sp. CJ-105, was effective in decolorizing a wide range of structurally different synthetic dyes.

염료는 현재 산업체에서 대략 10,000여종이 사용되고 있으며 공정 중에서 약 10~15%정도가 유출되고 있다. 이들은 대부분 분해되기 어려운 난분해성 물질로서 독성을 나타내고 있으며 그 색도는 공정 중에서 그대로 방류되어 심리적으로 많은 피해를 주게된다. 또한, 염료의 복잡성과 화합물의 다양한 화학적 구조로 인하여 유용한 분해방법이 아직 확립되어 있지 않으며 보편적으로 사용하는 물리, 화학적인 방법은 비용이 많이 들고 적용범위에 한계가 있다. 따라서, 최근에는 생물학적 방법에 대한 연구가 많이 진행되고 있으며, 그 중에서 혼합미생물을 이용한 염료의 색도제거 및 처리공정을 개발하려는 연구가 진행되고 있으나 처리농도가 낮고 일부 염료는 전혀 제거하지 못하는 단점이 있다. 따라서, 각종 염료를 제거할 수 있는 새로운 미생물의 개발에 관심이 집중되고 있다.

미생물에 의한 염료의 색도제거는 방선균을 이용하거나 (1) *Pseudomonas*속을 이용한 연구가 보고되었고(2), 또한, 균류를 이용한 연구가 보고되고 있는데 지금까지 균류는 주로 식품, 의약품으로서 자실체를 이용하고 있으며, 산업 폐수 및 유해환경오염물질의 처리 등 환경적인 측면에서는 활용이 미미한 실정이다. 담자균류(Basidiomycetes)에 속하는 백색부후균은 리그닌분해효소군(ligninolytic enzymes)에 의해 다양한 범주의 난분해성 화합물을 비특이적으로 분해할 수 있기 때문에 이를 환경에 응용하려는 연구가 진행되고 있으며 그 중에서 주로 *Phanerochaete chrysosporium*을 이용한 연구가 많이 보고되고 있다(3-7).

본 연구는 직접 자연계로부터 분리한 백색부후균의 일종인 *Trametes* sp. CJ-105 KFCC 10941을 이용하여 각종 염료에 대한 색도제거 능력과 효소활성, 성장성을 비교함으로써 향후 염색폐수등 난분해성 물질의 생물학적 처리에 대한 응용가능성을 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

균주

본 연구에 사용한 균주는 경기도 광릉, 강원도 설악산, 오대산 지역에서 채취한 버섯들로부터 분리한 *Trametes* sp. CJ-105로서 한국중균협회에 기탁, 보관되어 있는 균주(KFCC 10941)이며 YM 배지(yeast extract 3 g/l, malt extract 3 g/l, glucose 10 g/l, peptone 5 g/l, agar 17 g/l, pH 6.8)의 사면배지에서 27°C로 배양한 후 4°C에서 보관하였다.

시약

본 연구에 사용한 염료는 아조계인 congo red, methyl orange, 중합계인 poly R-478, 반응성 염료인 안트라퀴논계 remazol brilliant blue R, crystal violet이며 Sigma사에서 구입하였고 기타 실험에는 특급 및 일급시약을 사용하였다.

배양

상기의 *Trametes* sp. CJ-105 균사체의 선단을 코크보러(직경 6 mm)로 취하여 YM평판배지의 중앙에 접종하였으며, 25~28°C의 항온기(Precision, GCA)에서 1주일 동안 배양하였다. 그후 종균용 평판배지에서 배양된 균

*Corresponding author

Tel. 82-336-39-4362, Fax. 82-336-32-2784

E-mail: yj-jeon@www.cheiljedang.com

Key words: Decolorization, *Trametes* sp. CJ-105, White-rot fungus

사체의 선단을 코크보러(직경 6 mm)로 취하여 한천을 제외한 같은 조성의 액체배지 50 ml을 함유하는 250-ml 플라스크에 접종하여 25±1℃의 항온기에서 5일간 정치배양하였다.

염료의 색도제거

상기 액체배양액을 5,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 얻어진 균사체를 멸균 증류수로 2회 세척하여 배지성분을 제거한 후에 증류수 50 ml을 첨가하여 블렌더로 1분간 균질화하였다. 각각의 염료 100 ppm이 첨가된 nitrogen-limited medium(NLM) 액체배양배지(glucose 15 g/l, malt extract 400 mg/l, MnCl₂ 0.3 mg/l, FeSO₄ · 6H₂O 4 mg/l, MgSO₄ · 7H₂O 40 mg/l, 2,2-dimethylsuccinic acid 2.9 g/l, pH 5.0) 100 ml을 함유한 500-ml 플라스크에 5%(v/v)씩 접종한 후 25±1℃의 진탕회전배양기(Vision, VS-8480SR)를 사용하여 150 rpm으로 배양하였다(8). 사용한 염료의 구조와 특성은 Table 1에 나타내었다.

색도제거 측정

액체배양배지(NLM배지)에서 1 ml의 표본을 무균적으로 채취하여 원심분리기(Vision, VS15000CFN)에서 15,000 rpm으로 5분간 처리한 후 균사체와 입자를 제거하였다. 처리된 상등액을 적당량 희석한 후 분광광도계(Milton Roy, Genesys2)를 이용하여 scanning 및 흡광도를 측정하였으며 최대 흡광파장에서의 흡광도 감소(8)

Table 1. Structure and characteristics of dyes

Dye	Structure	MW	Color	λ _{Max.}
Methyl orange		327.3	orange	464 nm
Congo red		696.7	red	497 nm
Poly R-478		-	violet	521 nm
Remazol blue		626.5	blue	596 nm
Crystal violet		407.99	purple	591 nm

또는 각 염료별 두 파장에서의 흡광비율(ratio)의 감소(9)를 비교하여 색도제거효율을 판정하였다.

균체의 성장측정

액체배지 전체를 미리 무게를 측정한 filter paper(Whatman No. 5)를 사용하여 여과한 후 균사체를 증류수로 2회 세척하고 90℃ dry oven에서 12시간 건조하여 건조 균사체량을 측정하였다.

효소의 활성측정

액체배양배지(NLM배지)에서 1 ml의 표본을 취하여 원심분리기에서 4℃, 15,000 rpm으로 5분간 원심분리한 후 상등액을 분광광도계를 이용하여 리그닌 분해효소의 활성을 측정하였다.

Laccase(p-diphenol oxidase, E.C. 1.10.3.2)의 효소 활성도

0.1 M Sodium acetate(pH 5.0)완충액 2.5 ml, 시료 0.17 ml을 혼합한 후 5 mM ABTS(2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate) 0.33 ml을 첨가하여 1분간 반응시키면서 420 nm에서 흡광도의 차이를 측정하였다(molar extinction coefficient=36,000 M⁻¹cm⁻¹). 효소의 활성단위는 분당 1 μmol의 ABTS를 산화시키는 효소의 양을 1 unit로 정하였다(10).

Lignin peroxidase(E.C. 1.11.1.14)의 효소 활성도

0.25 M Sodium tartrate(pH 2.5)완충액에 10 mM veratryl alcohol용액과 시료를 혼합한 후 5 mM의 hydrogen peroxide를 첨가하여 1분간 반응시키면서 310 nm에서 흡광도의 차이를 측정하였다(molar extinction coefficient=9300 M⁻¹cm⁻¹). 효소의 활성단위는 분당 1 μmol의 veratryl alcohol을 veratryl aldehyde로 산화시키는 효소의 양을 1 unit로 정하였다(11).

Mn(II)-dependent peroxidase(E.C. 1.11.1.13)의 효소 활성도

0.5 M Sodium tartrate(pH 5.0)완충액에 1 mM syringaldazine, 1 mM MnSO₄와 시료를 혼합한 후 1 mM의 hydrogen peroxide를 첨가하여 1분간 반응시키면서 525 nm에서 흡광도의 차이를 측정하였다(molar extinction coefficient=65,000 M⁻¹cm⁻¹). 효소의 활성단위는 분당 1 μmol의 syringaldazine을 산화시키는 효소의 양을 1 unit로 정하였다(11).

결과 및 고찰

Trametes sp. CJ-105에 의한 염료의 색도제거

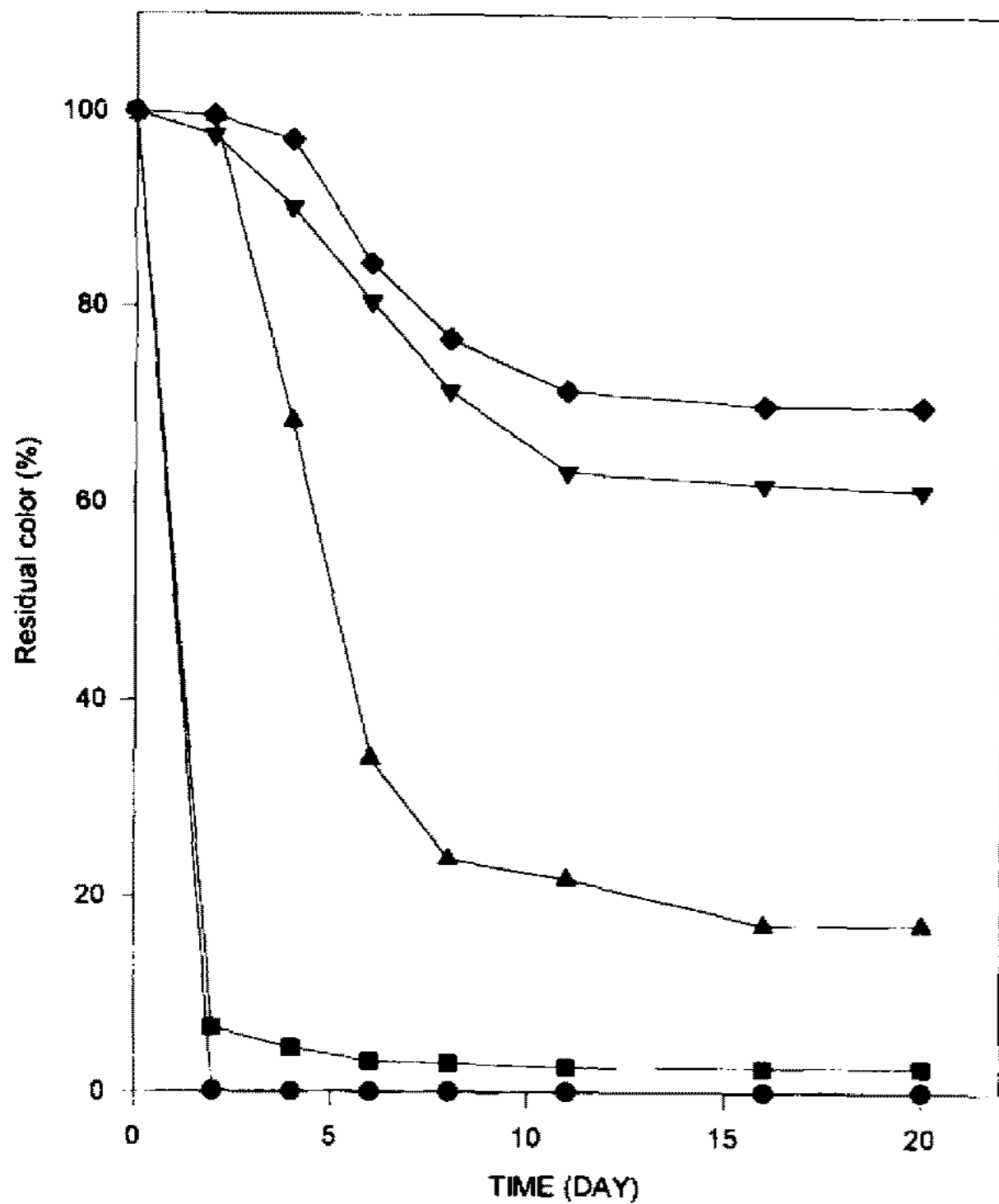


Fig. 1. Decolorization of dyes by *Trametes* sp. CJ-105. (●, Remazol brilliant blue R; ■, Methyl orange; ▲, Congo red; ▼, Crystal violet; ◆, Poly R-478).

자연으로부터 분리한 *Trametes* sp. CJ-105에 의한 각 염료의 색도제거효율을 비교하기 위해 *Trametes* sp. CJ-105의 균사체를 배양한 액체배양액에서 배지성분을 제거하고 증류수를 첨가시켜 균질화한 다음 각각의 염료가 100 ppm씩 첨가된 NLM배지에 5%(v/v)를 접종하였다. 그후 매일 1 ml의 표본을 채취하여 원심분리한 후 상등액에 대하여 scanning 및 흡광도를 측정하여 색도제거효율을 비교하였다. Fig. 1에서와 같이 remazol brilliant blue R의 경우는 배양 2일째에 거의 제거되었으며, methyl orange는 배양 2일째에 약 90%이상이 제거되었다. Congo red는 배양 2일째부터 제거되기 시작하여 10일 후에는 약 80%의 색도가 제거되었고, crystal violet의 경우는 배양 2일째에 제거되기 시작하여 10일 후에 약 40%의 색도가 제거되었으며, poly R-478은 2일째에 제거되기 시작하여 10일 후에 약 30%가 제거되었다. 이와 같은 결과는 Pasti-Grigsby 등(6)이 *Phanerochaete chrysosporium*에 의해 methyl orange를 150 ppm농도에서 15일 배양 후 약 90%이상 분해되었음을 보고한 것과 Chahal 등(12)이 50 ppm의 remazol brilliant blue R에 대하여 *P. chrysosporium*에 의해 배양 4일째에 색도가 제거되기 시작하여 7일째에 완전히 제거되고, *Pleurotus sajor-caju*에 의해서는 배양 8일째에 제거되기 시작해서 10일 후에 완전히 제거됨을 보고한 결과에 비해 *Trametes* sp. CJ-105가 상대적으로 좋은 색도제거효율을 보임을 나타낸다. 또한, Fig. 2에서와 같이 염료를 포함한 배양액에서 표본을 채취하여 scanning

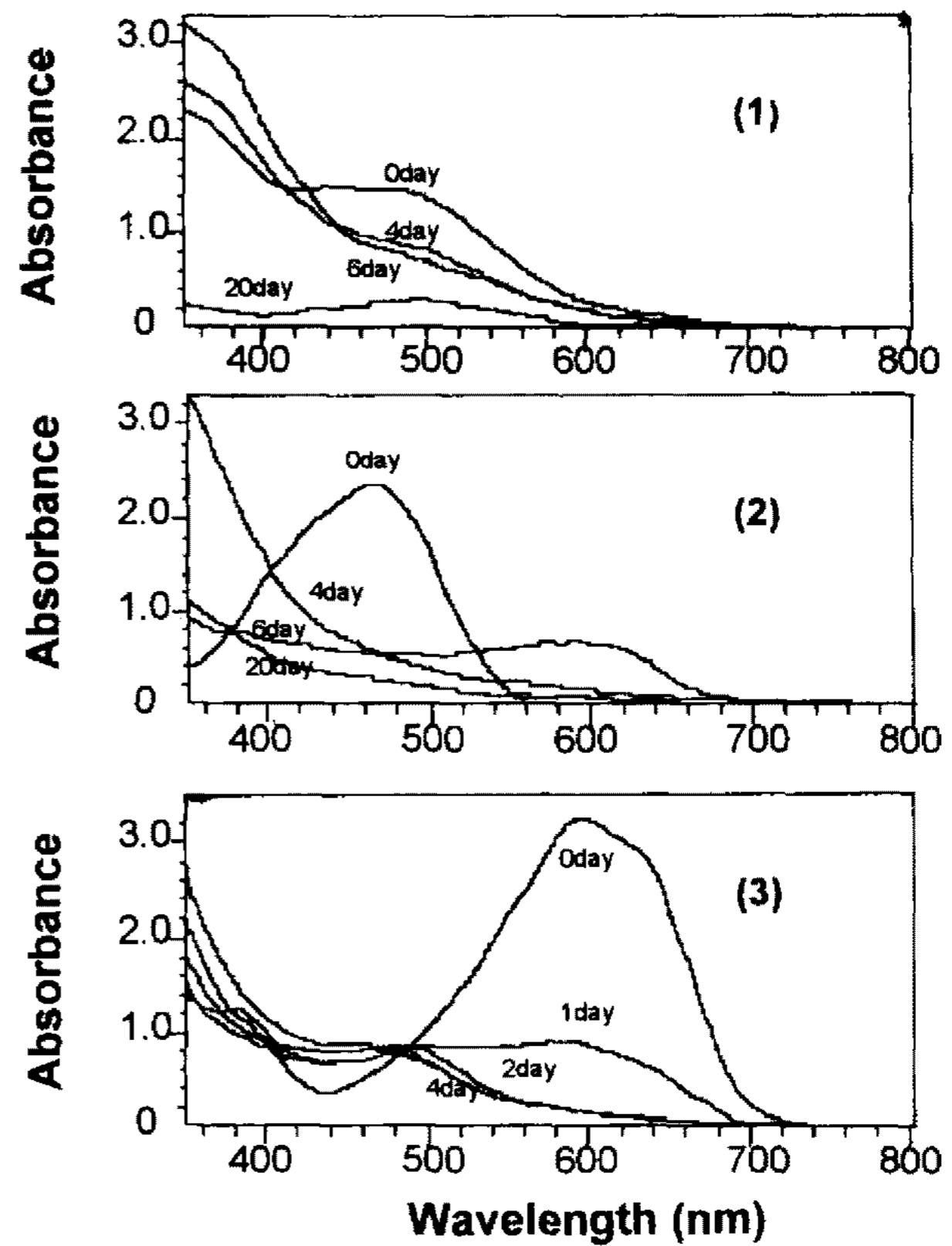


Fig. 2. Visible spectra during the decolorization of dyes by *Trametes* sp. CJ-105. [(1) Congo red; (2) Methyl orange; (3) Remazol brilliant blue R].

한 결과 초기에는 congo red, methyl orange, remazol brilliant blue R에 대하여 각각 497 nm, 464 nm, 595 nm에서 최대흡수영역을 보이다가 그 후에는 시간이 경과함에 따라 사라지는 것을 알 수 있다. 한편, pH를 5로 보정한 NLM배지에서 배양시간에 따른 pH변화는 관찰되지 않았다(data not shown).

색도제거효율에 관련한 균체의 성장성과 효소활성의 영향

각 염료에 대한 균체의 성장과 색도제거효율간의 상관성을 보기 위하여 배양 3일째에 각 염료를 포함한 NLM배지에서 *Trametes* sp. CJ-105의 건조균사체량을 측정하고 색도제거효율과 비교하였다. Table 2에서와 같이 생체량이 증가함에 따라서 색도제거효율도 증가하였으며, 상대적으로 균사체가 많이 성장한 염료에서 색도제거효과가 높게 나타났다. Fig. 3에서와 같이 congo red(100 ppm)의 경우에 성장이 진행되는 동안에도 색도가 제거되었으며 다른 염료의 경우도 같은 경향을 나타내었다. 또한, 염료를 첨가하지 않은 대조군에 비하여는 성장이 느리게 진행되었는데 이는 각 염료가 균체의 성장을 저해하는 것으로 판단된다(Fig. 4).

리그닌분해효소군은 주로 영양원이 고갈된 2차대사 중에 생성되어 리그닌을 비롯한 각종 화합물을 분해한다고

Table 2. Comparison of dyes on cell mass and decolorization^a

Dyes	Cell mass (mg dry weight/100 ml)	Decolorization (%)
Control ^b	25.6	-
Remazol brilliant blue R	16.8	100
Methyl orange	15.5	95.5
Congo red	11.8	31.7
Crystal violet	9.9	9.8
Poly R-478	6.5	2.3

^aCell mass and decolorization were measured after 3 days of culture. ^bControl was cultured without dyes.

보고되었다(13, 14). 그러나, 배양방법이나 반응조건에 따라서 효소의 활성이 나타나고 인위적으로 inducer와 cofactor를 첨가하여 효소를 생성하기도 한다(15, 16). 따라서, 색도제거에 있어서 리그닌 분해효소의 영향과 상관관계를 살펴보았다. 실제로 리그닌 분해효소의 경우에 laccase의 활성만이 검출되었으며, 시간에 따른 효소 활성과 분해효율의 상관성은 보이지 않았으나, Table 3에서와 같이 상대적으로 염료의 탈색정도에 비례하는 경향을 보이는 것으로 보아 염료의 색도제거에 있어서 laccase가 영향을 준다는 보고와 일치하였고(17), Ollikka 등(3)은 *P. chrysosporium*으로부터 정제한 lignin peroxidase에 의하여 각종 아조계, 중합계 염료의 색도제거를

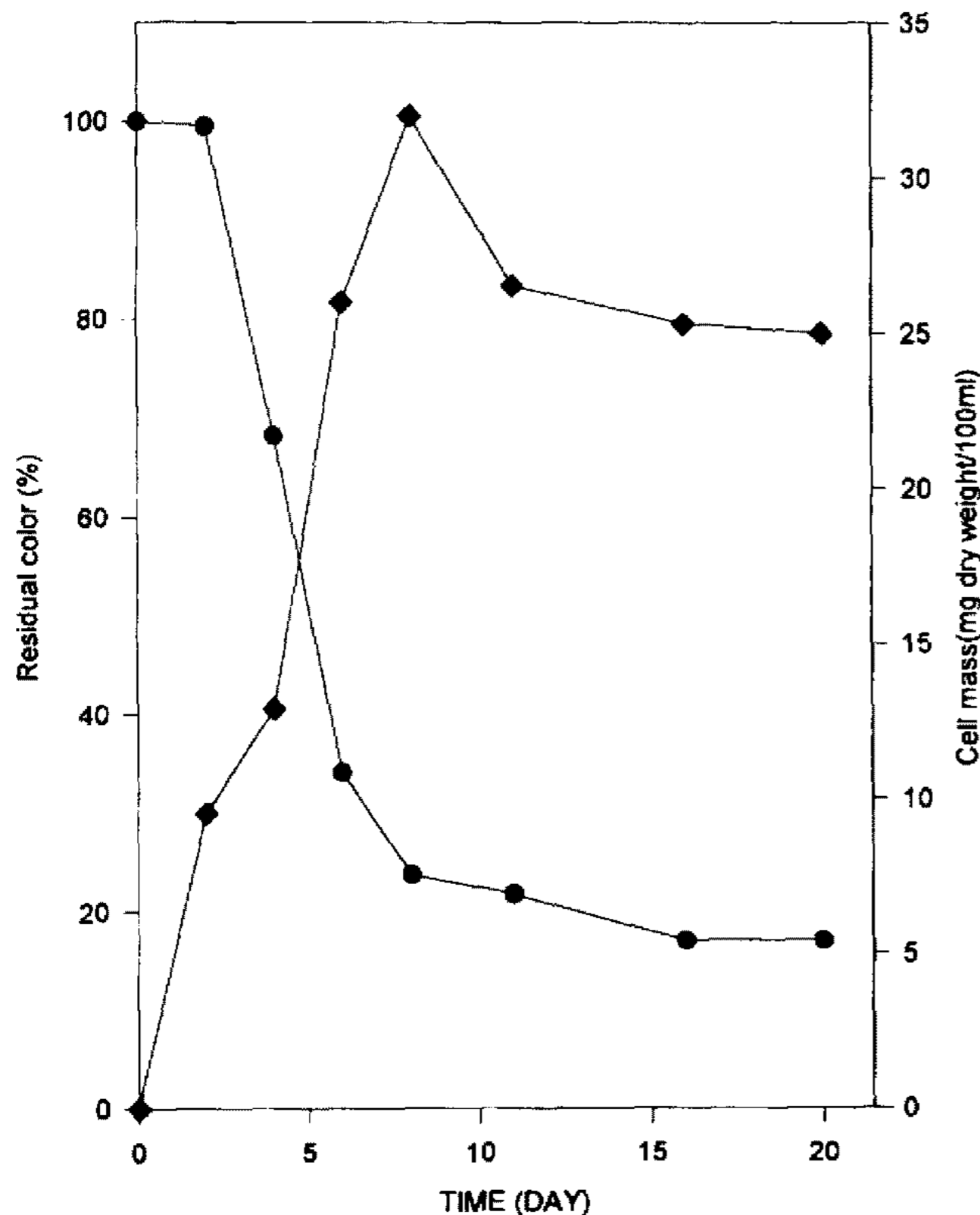


Fig. 3. Growth curve and decolorization change by *Trametes* sp. CJ-105 in the medium containing congo red. (●, Residual color (%); ◆, Cell mass (mg dry weight/100 ml)).

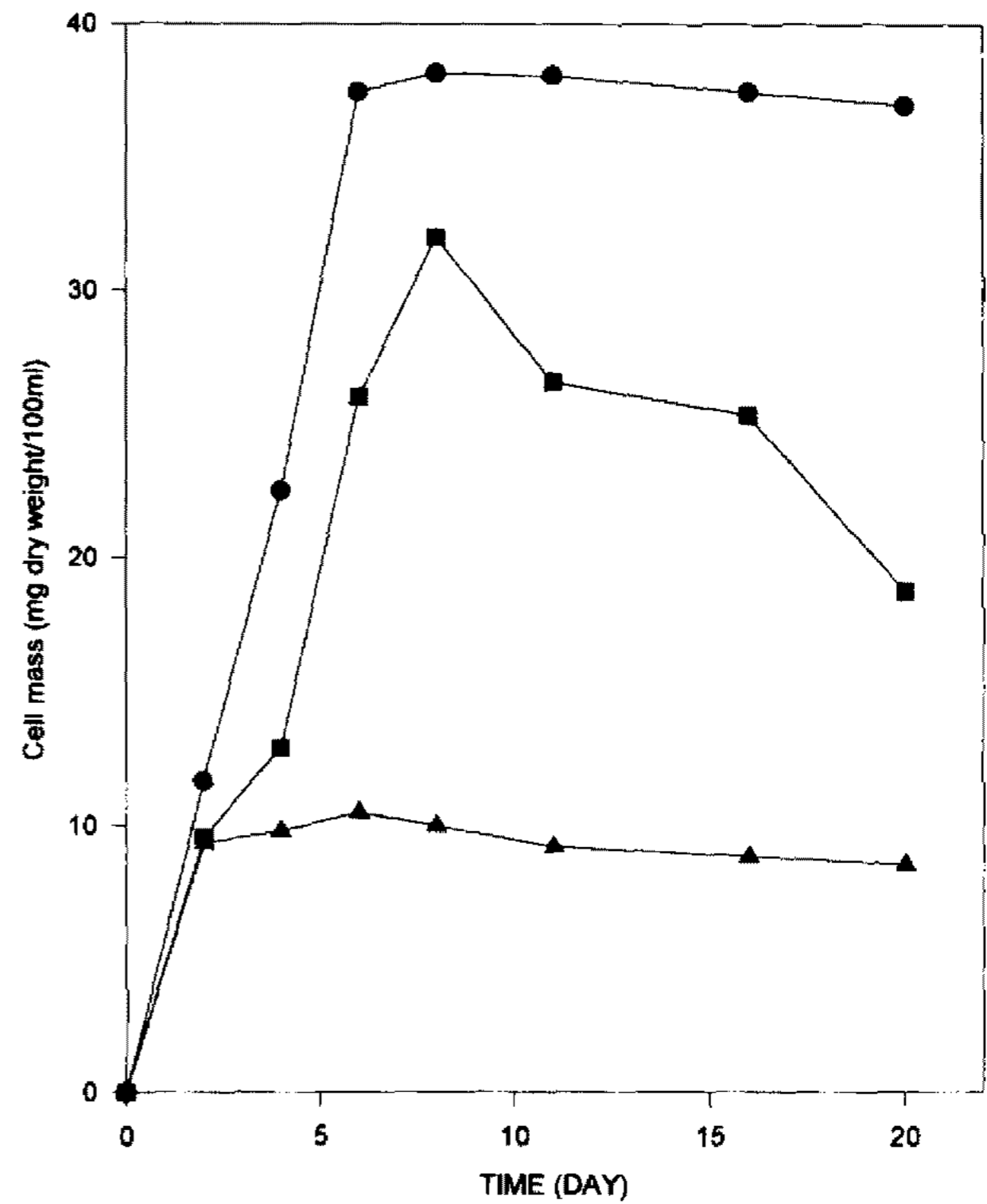


Fig. 4. Effect of dyes on the growth of *Trametes* sp. CJ-105. (●, Control; ■, Congo red; ▲, Crystal violet).

보고한 점에 비추어 염료의 색도제거에 리그닌 분해효소가 작용하는 것으로 판단된다. 또한, lignin peroxidase와 Mn(II)-dependent peroxidase의 활성이 나타나지 않은 것은 배양시에 산소공급의 부족, 또는 각종 inducer나 cofactor를 첨가하지 않은 영향도 있을 것으로 판단되며, 실제로 염료의 탈색이 non-ligninolytic하에서도 일어난다는 보고(4, 18)와 같이 다른 요인과 기작에 의하여 색도제거가 일어나는 것으로도 추정된다.

염료의 농도에 따른 색도제거와 효소활성

염료 중에 색도제거효율이 높고 laccase의 활성이 가장 많이 나타난 안트라퀴논계 염료인 remazol brilliant blue R의 경우에 대해 각각의 농도를 100 ppm, 200 ppm, 500 ppm, 1,000 ppm, 2,000 ppm 3,000 ppm으로

Table 3. Comparison of dyes on laccase activity and decolorization^a

Dyes	Relative activity (%)	Decolorization (%)
Remazol brilliant blue R	100 ^b	100
Methyl orange	55.8	95.5
Congo red	34.9	31.7
Crystal violet	27.9	9.8
Poly R-478	13.9	2.3

^aLaccase activity and decolorization were measured after 3 days of culture. ^bActivity: 8.4 Units/ml.

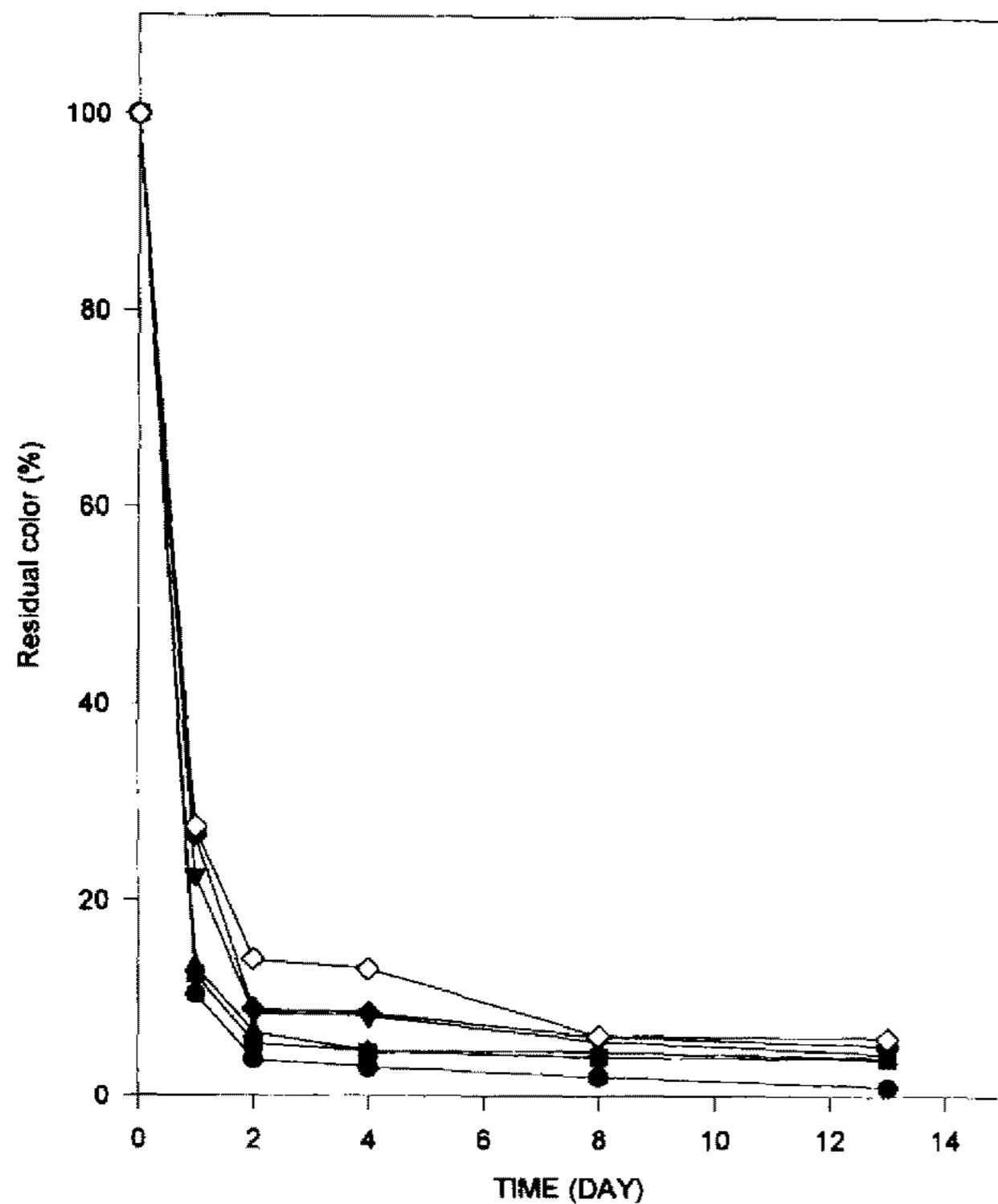


Fig. 5. Effect of the concentrations of remazol brilliant blue R on the decolorization by *Trametes* sp. CJ-105.

(●, 100 ppm; ■, 200 ppm; ▲, 500 ppm; ▼, 1,000 ppm; ◆, 2,000 ppm; ◇, 3,000 ppm).

Table 4. Correlation of remazol brilliant blue R and laccase activity^a

Dye concentration (ppm)	Laccase activity (U/ml)
100	8.4
200	10.0
500	14.7
1,000	25.8
2,000	30.5
3,000	38.2

^aLaccase activity was measured after 3 days of culture.

조정하여 배양한 결과 2일 경과 후에는 모든 농도에서 85%이상의 색도가 제거되었으며(Fig. 5), laccase의 활성도 염료농도에 비례적으로 나타났다(Table 4). 이와 같은 결과는 laccase가 ABTS나 remazol을 co-substrate로서 이용해서 각종 phenol화합물을 산화한다는 보고(19)와 일치하는 것으로 향후 각종 phenol성 화합물을 분해하는데 있어서 laccase의 효소활성을 높이는 데에 응용할 수 있을 것으로 판단된다.

이상과 같이 자연에서 분리한 백색부후균 *Trametes* sp. CJ-105가 여러 가지 염료에 대하여 색도제거효능을 지닌 것으로 판단되며 향후 효율적인 배양방법과 효소활성에 관한 적절한 inducer와 cofactor의 첨가 및 상호연관성, 효소간의 활성유지, 염료분해 기작에 대한 후속연구가 필요하다.

요 약

자연으로부터 분리한 *Trametes* sp. CJ-105에 의하여 아조계 염료인 congo red와 methyl orange, 중합계 염료인 poly R-478, 안트라퀴논계 염료인 remazol brilliant blue R, crystal violet에 대한 색도제거효능을 비교하였다. Remazol blue와 methyl orange의 경우는 배양 2일째에는 대부분 제거되었고, congo red는 배양 10일째에 80%이상 제거되었으며, crystal violet과 poly R-478은 배양 10일째에서 각각 40%, 30%가 제거되었다. 염료간에 상대적인 균체량이 많을수록 색도제거효과도 높게 나타났으며 리그닌분해효소군(ligninolytic enzymes)의 활성을 측정된 결과 laccase(E.C.1.10.3.2)의 활성만이 측정되었고, 염료간 효소활성이 색도제거효율과 상대적으로 비례하여 나타났다. 색도제거율과 laccase활성이 가장 우수한 remazol brilliant blue R의 농도를 100 ppm에서 3,000 ppm까지 조정하여 배양했을 때 배양 2일 경과 후에 각 농도에서 85%이상의 색도가 제거되었고 laccase의 활성도 농도에 비례하여 나타났다. 이상의 연구결과에서 백색부후균인 *Trametes* sp. CJ-105가 다양한 염료에 대해서 색도제거의 효능을 지닌 것으로 판단되었다.

감사의 글

본 연구는 1996년도 통상산업부 공업기반기술개발사업의 일환으로 수행되었습니다.

참고문헌

- Ball, A. S., W. B. Betta and A. J. McCarthy. 1989. Degradation of lignin-related compounds by actinomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 1642-1644.
- Hu, T. L. 1994. Decolorization of reactive azo dyes by transformation with *Pseudomonas luteola*. *Bioresour. Technol.* **49**: 47-51.
- Ollikka, P., K. Alhonen, V. Leppänen, T. Glumoff, T. Rajola and I. Suominen. 1993. Decolorization of azo, triphenyl methan, heterocyclic, and polymeric dyes by lignin peroxidase isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 4010-4016.
- Bumpus, J. A. and B. J. Brock. 1988. Biodegradation of crystal violet by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 1143-1150.
- Glenn, J. K. and M. H. Gold. 1983. Decolorization of several polymeric dyes by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**: 1741-1747.
- Pasti-Grigsby, M. B., A. Paszczynski, D. L. Crawford and R. L. Crawford. 1992. Influence of aromatic substitu-

- tion patterns on azo dye degradability by *Streptomyces* spp. and *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3605-3613.
7. Spadaro, J. T., M. H. Gold and V. Renganathan. 1992. Degradation of azo dyes by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 2397-2401.
 8. Knapp, J. S., P. S. Newby and L. P. Reece. 1995. Decolorization of dyes by wood-rotting basidiomycete fungi. *Enzyme Microb. Technol.* **17**: 664-668.
 9. Platt, M. W., Y. Hadar and I. Chet. 1985. The decolorization of polymeric dye poly-blue (polyvinylamine sulfonate-anthraquinone) by lignin-degrading fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**: 394-396.
 10. Roy-Arcand, L. and F. S. Archibald. 1991. Direct dechlorination of chlorophenolic compounds by laccases from *Trametes (Coriolus) versicolor*. *Enzyme Microb. Technol.* **13**: 194-203.
 11. Tien, M. and T. K. Kirk. 1988. Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Methods Enzymol.* **161**: 238-249.
 12. Chahal, D. S., D. Kluepfel, R. Morosoli, F. Shareck, S. Laplante and D. Rouleau. 1995. Use of dyes in solid medium for screening ligninolytic activity of selective actinomycetes. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **51**: 137-144.
 13. Shimada, M., F. Nakatsubo, T. K. Kirk and T. Higuchi. 1981. Biosynthesis of the secondary metabolite veratryl alcohol in relation to lignin degradation in *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Microbiol.* **129**: 321-324.
 14. Keyser, P., T. K. Kirk and J. G. Zeikus. 1978. Ligninolytic enzyme system of *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Bacteriol.* **135**: 790-797.
 15. Lundquist, K. and T. K. Kirk. 1978. De novo synthesis and decomposition of veratryl alcohol by a lignin-degrading basidiomycete. *Phytochem.* **17**: 1676-1676.
 16. Bonnarne, P. and T. W. Jeffries. 1990. Mn(II) regulation of lignin peroxidases and manganese-dependent peroxidases from lignin-degrading white rot fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 210-216.
 17. Chivukula, M. and V. Renganathan. 1995. Phenolic azo dye oxidation by laccase from *Pyricularia oryzae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 4374-4377.
 18. Cripps, C., J. A. Bumpus and S. D. Aust. 1990. Biodegradation of azo and heterocyclic dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 1114-1118.
 19. Bourbonnais, R., M. G. Paice and I. D. Reid. 1992. Lignin oxidation and pulp delignification by laccase of *Trametes versicolor* in the presence of ABTS. *International conference on biotechnology in the pulp and paper industry*, P.181-186. 5th ed. Kyoto Japan.

(Received 25 August 1997)