한국환경과학회지 제7권(제3호), 263~267, 1998
J. of the Korean Environmental Sciences Society

고정화된 백색부후균을 이용한 염료의 탈색에 관한 연구

원 찬 희 · 김 종 신 · 박 상 숙*
전북대학교 환경공학과 · *순천대학교 환경공학과
(1997년 11월 26일 접수)

A Study on Decolorization of Dyes with an Immobilized White Rot Fungus *Irpex lacteus*

Chan-Hee Won, Jong-Sin Kim, and Sang-Sook Park*
Dept. of Environmental Engineering, Chonbuk National Univ., Chonju
**Dept. of Environmental Engineering, Sunchon National Univ., Sunchon*
(Manuscript received 26 November 1997)

Decolorization of congo red, rhodamine B was investigated by the white rot fungus *Irpex lacteus* which has biodegrading capability of various recalcitrants. White rot fungus *Irpex lacteus* is immobilized by PVA-freezing method. An immobilized *Irpex lacteus* decolorizes 91% of congo red in 8 days under culture with glucose 2%(initial conc.). It also showed 70% of decolorization at 3 days in the state of putting $MnSO_4$ 1mM.

But, rhodamine B has no significant differences about decolorization among different mixture ratio of *Irpex lacteus* with PVA, concentration of carbon, nitrogen and manganese sulfate.

Key words : decolorization, white rot fungus, *Irpex lacteus*, congo red, rhodamine B, immobilize

1. 서 론

염료는 염색공업과 섬유산업에서 배출되는 폐수중에 포함되어 자연환경에 배출되고, 세척과 햇빛에 저항성을 가지므로 일반적인 폐수처리공법으로는 제거되지 않으며, 자연환경에서도 쉽게 분해되지 않는다. 대부분의 염료들은 수생태계에 큰 독성을 미치지는 않고 있으나 심미적으로 악영향을 미치고 있다.

염색폐수중에 포함되어 있는 염료는 분해되기 어려운 중합체로 구성되어 있고 호기성 미생물에 대한 에너지원으로도 적합하지 않는 것으로 보고되고 있어 물리화학적 공정을 이용한 처리방법을 도입하고 있다. 물리화학적 공정에서 효과적으로 색상을 제거하기 위해서는 고가의 응집제겸 탈색제를 사용하여야 하나 경제성 때문에 많은 문제점을 가지고 있다.

백색부후균은 lignin을 분해할 수 있는 능력이 있는 균주이며, 여기에 관여하는 체외효소는 laccase, lignin peroxidase(LiP), manganese -dependent peroxidase (MnP) 등으로 알려져 있다. 이러한 효소가 발현되기 위해서는 탄소와 질소의 양이 제한인자로서 작용하고 이에 따라 폭넓은 종류의 유기성화학물질이 분해되는 것으로 보고되고 있다(David and Steven, 1994 ; Bumpus and Brick, 1988 ; Cripps *et al.*, 1990). 이러한 특성을 이용하여 염료의 생분해를 시도하는 연구가 보고되고 있으며 특히 백색부후균중 *Phanerochaete chrysosporium*을 이용한 연구가 가장 활발하다(Cripps *et al.*, 1990 ; Paszcyzynski *et al.*, 1991 ; Pasti-Grigsby *et al.*, 1992). 이러한 백색부후균의 능력은 장래 염색공장폐수 처리를 위한 해결의 실마리를 줄 수 있다고 생각된다.

본 연구의 목적은 생물학적 공정을 주로한 염색폐수 처리기술 개발을 위한 기초적 연구로서 백색부후균을 고정화하여 염료의 분해특성을 파악하는 것이다. 이를 위하여 염료중 congo red와 rhodamine B를 대상으로 하여 고정화한 백색부후균 *Irpex lacteus*를 이용하여 탄소, 질소 및 망간이온의 첨가에 따른 염료의 탈색을 검토하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 균주 및 재료

본 연구에서 사용한 균주는 백색부후균중 *Irpex lacteus*이며 서울대학교 미생물연구소에서 분양받았다. 균주확보를 위해 39℃에서 Table 1에 나타난 고체배지에서 균주를 생산하여 4℃에서 사용전까지 유지보관하였고 1개월마다 주기적으로 계대배양을 하였다. 고정화 균체생산을 위해 Table 1에 나타난 조성에서 agar를 제외시킨 액체배지에서 배양하였다(Tien and Kirk, 1983).

일반적으로 미생물의 포괄고정법에 이용되고 있는

Table 1. The compositions of maintenance and spores production medium

Items	Medium(g/l)
D-glucose	10
malt extract	10
peptone	2
yeast extract	2
asparagine	1
KH_2PO_4	2
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1
thiamin-HCl	0.001
agar	20

Table 2. The mixture ratio of white rot fungus with PVA

	White rot fungus	Mixture ratio
I 1:1	*Irpex lacteus*	1 : 1 (W/W)
I 1:2	*Irpex lacteus*	1 : 2 (W/W)
I 2:1	*Irpex lacteus*	2 : 1 (W/W)

고분자소재로서는 Na-alginate, Ca-alginate, *k*-Carraqueenan, PVA, agarose, 아크릴아마이드 등이 보고되고 있으며(조영일, 1991), 이중 고정화재료로 PVA를 선정하여 농도는 20%를 사용하였다.

백색부후균의 고정화는 액체배지에서 약 1주일간 배양한 백색부후균을 원심분리기(VS-5000, Vision Science)로 3,000rpm으로 5분동안 농축한 후 Fig. 1의 순서에 의해 PVA-냉동법으로 고정화를 하였다(정재춘, 1991).

PVA를 이용한 고정화 방법에 따라 중량비 2:1 - 1:2정도로 백색부후균과 PVA를 혼합한후 air호스(내경 4mm)에 주입한 후 -4℃에 1일간 냉동하여 air호스를 3 - 4mm간격으로 절단하여 고정화 pellet을 만들었다.

본 연구에서 사용된 염료는 congo red(C.I. Direct Red 28, $C_{32}H_{22}N_6Na_2O_6S_2$)와 rhodamine B(C.I. Basic Violet 10, $C_{28}H_{31}ClN_2O_3$)이며, 이중 congo red는 일반 미생물에 의해 분해가 어려운 것으로 알려진 azo기(-N=N-)를 2개 가지고 있는 직접염료이고, rhodamine B는 염기성염료의 xanthene 염료에 해당된다.

2.2 실험 및 분석방법

300ml 삼각플라스크에 상기한 염료(congo red 5μM, rhodamine B 1μM)를 각각 25ml씩 넣고 고정화 pellet를 50개씩 넣고 공기를 주입하면서 시간경과에 따른 색도를 관찰하였다.

각 염료별로 고정화된 pellet과 탄소원, 질소원, 망간이온을 첨가하여 생분해성을 관찰하였으며, 본 실험은 39℃의 incubator에서 수행하였다.

색도측정은 배양액을 3000rpm에서 6분동안 원심분리한 후 상등액을 검수로 하였고, Standard Methods (APHA, AWWA, WEF, 18th ed., 1992)에 제시된 ADMI Tristimulus Filter Method을 이용하였다.

3. 결과 및 고찰

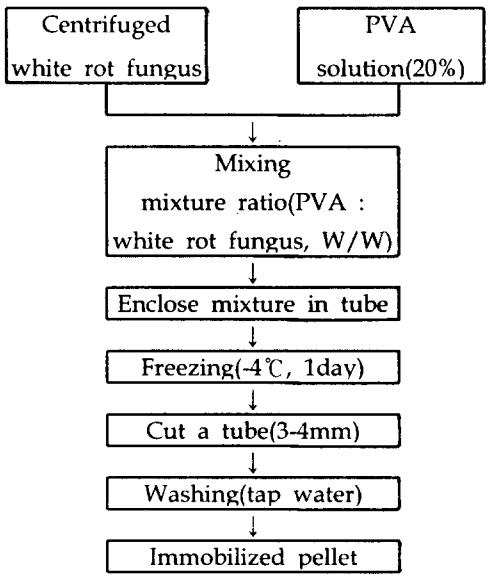

Fig. 1. Immobilization using a PVA-frozen method.

3.1 탄소원의 첨가에 따른 영향

백색부후균의 대사특성중 탄소의 제한 또는 과잉에 따라 기질을 분해하는 특성을 이용하기 위해 탄소원을 첨가하여 염료의 생분해도를 관찰하였다. 본 연구에서는 glucose를 선택하였으며, 초기농도는 0.5%, 1%, 2%로 하여 경시적인 색도의 변화를 관찰하였다.

Congo red를 대상으로 하여 glucose 첨가량에 따른 색도 제거율을 살펴본 결과는 다음과 같다. 먼저 Fig. 2는 PVA와 *Irpex lacteus*과의 혼합비 1:1의 경우로서 (I 1:1) glucose농도 2%일 때 반응 8일째에 91%의 색도제거를 나타내고 있다. Fig. 3에서는 PVA와 *Irpex lacteus*과의 혼합비 1:2의 경우로서(I 1:2) 색도제거율은 glucose 2%첨가시 반응 8일째에 82.8%를 나타내고 있다. Fig. 4에서는 PVA와 *Irpex lacteus*와의 혼합비 2:1의 경우로서(I 2:1) 색도제거는 반응 8일째에 glucose 2%를 첨가한 것에서 86.8%로 나타났다. 따라서 탄소원을 첨가할수록 색도제거에 효율적임을 보이고 있으며, 최대 색도제거율은 I 1:1로 운전하며, 초기 glucose농도 2%에서 반응 8일째에 91%로 관찰되었다.

이러한 결과는 백색부후균 *Phanerochaete chrysosporium, Pleurotus ostraeatus, Irpex lacteus* 등을 이용하여 congo red를 배양조건하에서 7일만에 100%에서 85%의 제거율을 보고하고 있는 결과(Kim *et al.*, 1995)와 비슷한 것으로 나타났다.

Rhodamine B를 대상으로 하여 각 미생물별 혼합비별로 탄소원으로써 glucose를 첨가하면서 색도 제거율을 살펴보면 Fig. 5(I 1:1)에서 glucose를 첨가하지 않은 반응에서 반응 3일째에 87.8%의 색도제거율을 보이고 있으며, 첨가된 glucose의 농도가 적을수록 색도제거에 효과적임을 보이고 있다. Fig. 6(I 1:2)에서도 이와 유사한 경향을 보이고 있으며, glucose 무첨가시가 반응 3일째에 90.4%의 높은 색도 제거율을 보이고 있다. Fig. 7(I 2:1)에서도 glucose를 첨가하지 않은 반응에서 반응

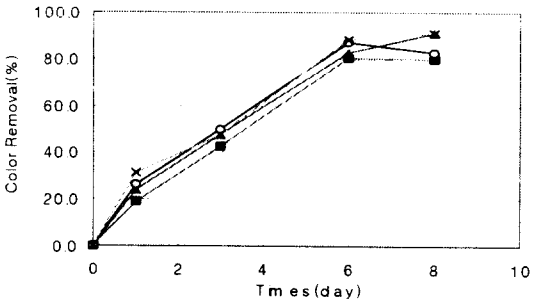

Fig. 2. The effect of glucose concentration on decolorization of congo red with immobilized *Irpex lacteus*(I 1:1).
▲:0.5%, ○:1.0%, ×:2%, ■:without glucose

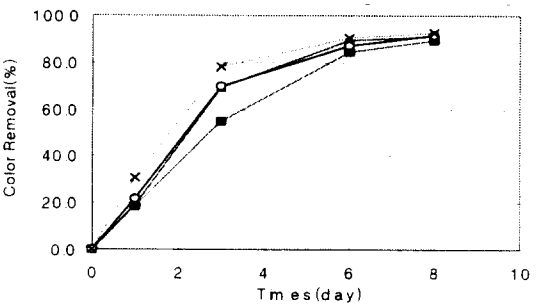

Fig. 3. The effect of glucose concentration on decolorization of congo red with immobilized *Irpex lacteus*(I 1:2).
▲:0.5%, ○:1.0%, ×:2%, ■:without glucose

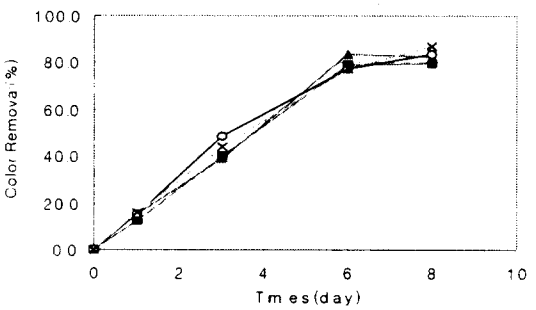

Fig. 4. The effect of glucose concentration on decolorization of congo red with immobilized *Irpex lacteus*(I 2:1).
▲:0.5%, ○:1.0%, ×:2%, ■:without glucose

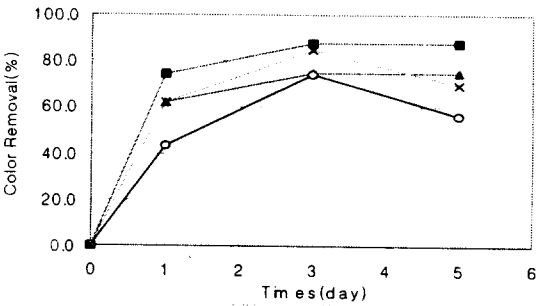

Fig. 5. The effect of glucose concentration on decolorization of rhodamine B by immobilized *Irpex lacteus*(I 1:1).
▲:0.5%, ○:1.0%, ×:2%, ■:without glucose

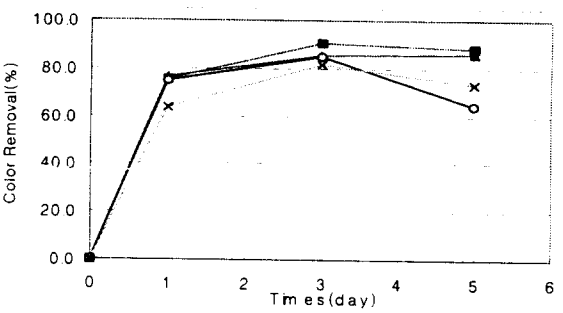

Fig. 6. The effect of glucose concentration on decolorization of rhodamine B by immobilized *Irpex lacteus*(I 1:2).
▲:0.5%, ○:1.0%, ×:2%, ■:without glucose

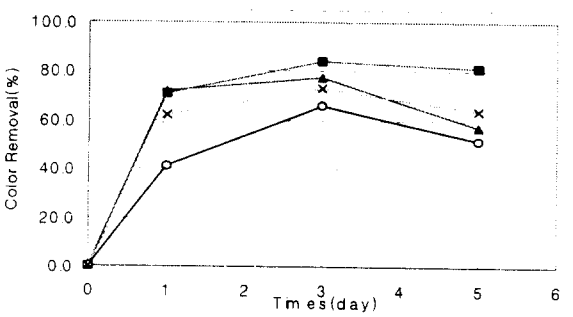

Fig. 7. The effect of glucose concentration on decolorization of rhodamine B by immobilized *Irpex lacteus*(I 2:1).
▲:0.5%, ○:1.0%, ×:2%, ■:without glucose

3일째에 83.8%의 색도제거율을 보이고 있는 것으로 나타났다.

3.2 질소원의 첨가에 따른 영향

백색부후균의 대사특성중 질소의 제한 또는 과잉에 따라 기질을 분해하는 특성을 파악하기 위해 질소원으로서 ammonium tartrate를 첨가하여 염료의 생분해도를 관찰하였다. 실험초기의 ammonium tartrate의 농도는 각각 0.005%, 0.01%, 0.02%이었다.

질소원으로써 ammonium tartrate를 첨가한 경우의 색도변화율을 살펴본 결과 혼합비에 관계없이 ammonium tartrate를 첨가하지 않은 경우가 가장 우수한 색도제거능을 보이고 있으며, 질소를 첨가한 반응에서 질소농도에 관계없이 최대 색도제거율은 각각 17%(I 1:

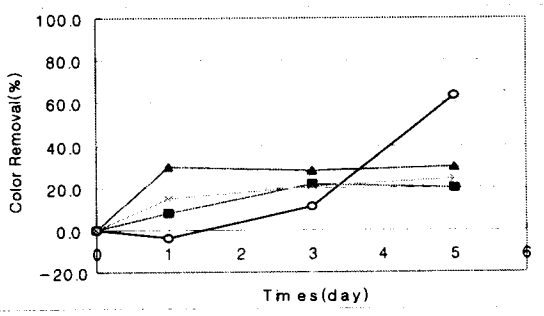

Fig. 8. The effect of manganese sulfate concentration on decolorization of congo red with immobilized *Irpex lacteus*(I 1:1). ▲:0.5mM, ○:1.0mM, ×:2.0mM, ■: without $MnSO_4$

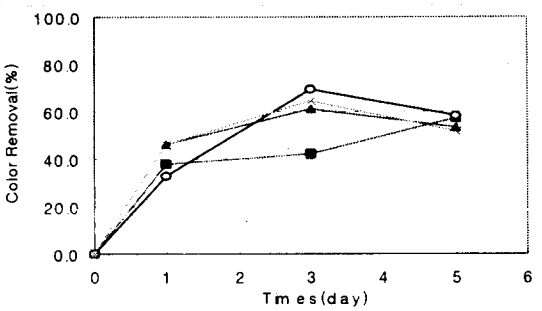

Fig. 9. The effect of manganese sulfate concentration on decolorization of congo red with immobilized *Irpex lacteus*(I 1:2). ▲:0.5mM, ○:1.0mM, ×:2.0mM, ■: without $MnSO_4$

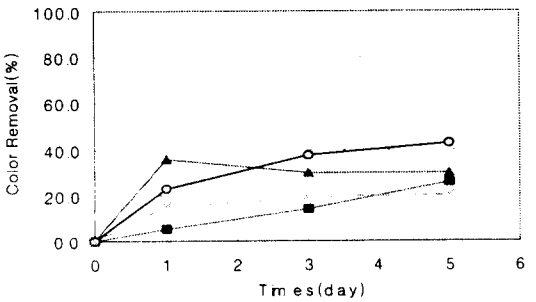

Fig. 10. The effect of manganese sulfate concentration on decolorization of congo red with immobilized *Irpex lacteus*(I 2:1). ▲:0.5mM, ○:1.0mM, ×:2.0mM, ■: without $MnSO_4$

1), 19%(I 1:2), 10%(I 2:1)로 관찰되었다. 질소를 첨가하지 않은 경우의 최대 색도제거율은 I 1:2의 반응에서 반응 5일째에 61.7%로 나타났다.

Rhodamine B의 경우도 congo red와 마찬가지로 질소원을 첨가하지 않은 경우가 오히려 색도제거율이 높음을 보여주고 있다. 질소를 첨가한 경우 질소의 농도에 관계없이 최대 색도제거율은 각각 36%(I 1:1), 37%(I 1:2), 18%(I 2:1)로 관찰되었다. 한편, 질소를 첨가하지 않은 반응중 PVA: *Irpex lacteus*의 혼합비가 1:2(I 1:2)인 경우에서 약 62%로 나타났다.

이러한 결과는 질소제한 배양조건하에서 *Phanerochaete chrysosporium*을 이용하여 배양 24시간후 crystal violet 및 cresol red는 100% 탈색효율을 보였고 bromophenol blue는 89.7%, brilliant green은 89.7%의 색도제거를 보였으며, 48시간후에는 100% 탈색된 결과(Bumpus and Brock, 1988)와 일치하고 있으며, *Phanerochaete chrysosporium*을 이용하여 congo red를 분해시킬 때 질소과잉 조건보다는 오히려 질소제한 조건하에서 배양 24시간동안 93%, 48시간동안 95%의 탈색효율을 보고(Cripps *et al.*, 1990)와 일치하고 있다.

따라서, 본 연구에 사용된 *Irpex lacteus*는 다른 백색부후균과 마찬가지로 질소를 제한하는 것이 색도제거에 효율적임을 나타낸다고 생각된다.

3.3 Mn이온의 첨가에 따른 염료의 분해성

백색부후균 등은 peroxidase 관련효소를 분비하는 것(David and Steven, 1994 ; Bumpus and Brick, 1988 ; Cripps *et al.*, 1990 ; Paszcyzynski *et al.*, 1991 ; Pasti-Grigsby *et al.*, 1992)으로 알려져 있는데 그 중 manganese-dependent peroxidase(MnP)는 Mn^{2+}에 의존적인 효소로 알려져 있어 Mn이온을 첨가하여 MnP의 활성을 증가시켜 염료의 생분해성을 높이고자 Mn이온을 첨가하였다. Mn이온원으로는 $MnSO_4$를 사용하였으며, 초기의 $MnSO_4$농도는 0.5mM, 1.0mM, 2.0mM로 조절하여 색도를 관찰하였다.

Congo red를 대상으로 하여 미생물 혼합비별로 $MnSO_4$를 첨가하면서 색도 제거율을 살펴보면 다음과 같다. Fig. 8은 고정화비율이 I 1:1인 경우로써 반응 5일째에 $MnSO_4$ 초기농도 1.0mM에서 63.5%의 색도제거율을 나타내었다. I 1:2의 경우(Fig. 9)에서는 $MnSO_4$를 첨가하지 않은 반응을 제외하고 60.9~69.3%의 제거율을 반응 3일째에 나타내었다. I 2:1의 경우(Fig. 10)에서는 $MnSO_4$ 초기농도 1.0 mM에서 42.9%의 색도제거율을 보였다. 따라서 $MnSO_4$ 초기농도 1.0mM이 색도제거에 효율적임을 보이고 있으며, 최대 색도제거율은 I 1:2로 운전하며, $MnSO_4$ 초기농도 1.0mM에서 반응 3일째에 69.3%로 관찰되었다.

Rhodamine B의 경우에서는 고정화된 미생물의 혼합비 및 첨가된 $MnSO_4$의 초기농도에 관계없이 거의 유사한 색도제거효율을 보이고 있는 것으로 관찰되었다. 고정화된 혼합비별 색도 제거율은 75.6%(I 1:1), 81.7%(I 1:2), 74.6%(I 2:1)의 효율을 각각 나타내고 있다.

4. 결 론

백색부후균 *Irpex lacteus*를 고정화하여 염료의 탈색실험의 결과는 아래와 같다.

1) 탄소원으로써 glucose를 첨가하여 congo red의 탈색율을 관찰한 결과 PVA와 미생물혼합비 1:1의 경우

(I 1:1)에서 반응 8일째에 glucose 2%를 첨가한 반응에서 91%로 나타났다. Rhodamine B의 경우에서는 congo red와는 달리 탄소원을 첨가하지 않는 반응이 우수한 색도제거율을 보였으며, PVA와 미생물혼합비 1:1의 경우(I 1:1)에서 glucose를 첨가하지 않은 반응 3일째에 90.4%로 나타났다.

2) 질소원의 첨가에 따른 탈색효율을 검토하기 위해 ammonium tartrate를 첨가한 경우에는 염료의 종류, 혼합비율에 상관없이 효과적인 색도제거를 보이지 않았다.

3) Mn이온을 첨가한 실험에서는 congo red를 대상으로 하였을 때 PVA와 미생물혼합비 1:2의 경우(I 1:2)에서 $MnSO_4$ 초기농도 1mM에서 3일째에 69.4%로 나타났다. Rhodamine B의 경우에서는 congo red와는 달리 $MnSO_4$의 초기농도에 관계없이 거의 유사하게 74.6 - 81.7% 정도의 색도제거 효율을 나타내었다.

감사의 글

본 연구는 1996년 연강재단의 환경관련 학술지원에 의해 수행되었으며 이에 감사를 드립니다.

참 고 문 헌

정재춘, 1991, 미생물고정화법에 의한 배수처리, 동화기술, 213-243pp.

조영일, 1991, 고정화생물촉매, 대광문화사, 9-159pp.

APHA, AWWA, WEF, 1992, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater", 18*th ed.*

Bumpus, J. and B. J. Brock, 1988, Biodegradation of crystal violet by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 54(5), 1143-1150.

Cripps, C., J.A., Bumpus and S.D., Aust, 1990, Biodegradation of azo and heterocyclic dyes by *Phanerochaete chrysosporium*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 56(4), 1114-1118.

David P. Barr, S. D. Aust, 1994, Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants, *Environ. Sci. Technol.*, 28(2), 78A-87A.

Kim, H.Y., Y.E. Leem, H.T. Choi and H.G. Song, 1995, Decolorization of dyes by white rot fungi, *Korea J. of Mycology*, 23(4), 298-304.

Yadav, J.S. and C.A. Reddy, 1993, Degradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylens (BTEX) by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 59(3), 756-762.

Pasti-Grigsby, M.B., Paszczynski, A., Goszczynski, S., Crawford, D.L. and Crawford, R.L., 1992, Influence of aromatic substition pattern on azo dye degradability by *Streptomycetes* spp. and *Phanerochaete chrysosporium*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 58(11), 3605-3613.

Paszczynski, A., Pasti-Grigsby, M.B., Goszczynski, S., Crawford, D.L. and Crawford, R.L., 1991, New approach to improve degradation of recalcitrant azo dye by *Streptomycetes* spp. and *Phanerochaete chrysosporium*, *Enzyme Microb. Technol.*, 13, 378-384.

Tien, M. and T. K. Kirk, 1983, Lignin-degrading enzyme from the hymeno-mycete *Phanerochaete chrysosporium* burds, *Science*, 221, 661-663.