

새로운 染色廢水 色度 除去 白色腐朽菌의 分離 및 色度 除去 效果

남윤구 · 권혁구 · 이봉준 · 이장훈[†]
호서대학교 환경안전공학부 환경공학과

Isolation of Novel White-rot Fungus and Effect for Decolorization of Dye Wastewater

Youn Ku Nam · Hyuk Ku Kwon · Bong Joon Lee · Jang Hoon Lee[†]

Department of Environmental Engineering, Graduate School Hoseo University, Asan 165, Korea
(Received May 8, 2006/Accepted August 9, 2006)

ABSTRACT

For decolorization of synthetic dyes, One fungus(HUE05-1) which was isolated from textile wastewater collected from industrial complex in Korea showed excellent ability of removing synthetic dyes. This fungus was identified as *Basidiomycetes species* by Internal Transcribed Spacers (ITS) sequence. Isolated fungi. HUE05-1, completely decolorized all dyes in both solid and liquid condition. The decolorization results were Reactive Orange-16, 97.12%; Reactive Blue-19, 92.09%; Reactive Blue-49, 97.04%; Reactive Yellow-145, 95.53%; Acid Orange-10, 99.18%; Acid Violet-43, 98.73%; Acid Blue-350, 94.71% and Disperse Blue-106, 90.07%.

Keywords: decolorization, white rot fungi, wastewater treatment, biodegradation, synthetic dye

I. 서 론

염료·염색 관련 산업폐수는 성분이 복잡할 뿐만 아니라, 공장규모에 비해 폐수의 발생량도 많은 실정이며 근본적으로 오염물질의 양을 감소시키거나 효율이 우수한 공정의 마련이 시급한 실정이다. 염료·염색폐수를 처리하기 위하여 물리·화학적 처리방법인 펜톤 산화, 오존산화, 전기분해, 흡착, 여과, 산화 등이 사용되고 있지만, 낮은 경제성과 넓은 정상범위를 가지는 염료·염색 폐수 처리에 부적합한 단점을 가지고 있다.¹⁻⁴⁾ 따라서 물리·화학적 요인들에 영향을 받는 문제점을 보완할 수 있는 생물학적 처리에 대한 연구가 주목을 받고 있다.^{5,6)}

일반적으로 염색가공 공정에서는 섬유유 종류와 염색 방법, 그리고 계절에 따라 폐수량이 다양하게 변하는 특성이 있다. 특히 섬유유 염색가공 공정과 종이의 염색, 화장품 산업 등의 폐수에는 합성염료로서 반응성염료가 가장 일반적으로 많이 포함되어 있으며,⁷⁾ 배출되

는 폐수에는 다양한 난분해성 물질들 뿐만 아니라 질소화합물로 구성된 화합물도 다량함유하고 있는 것으로 알려져 있다.

최근 특정 미생물이나 효소를 이용한 연구들이 활발히 진행되고 있으며, *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Funalia troglia*, *Aspergillus niger*, *Pleuteous ostrea* 등에 의한 염료제거는 비특이적 효소의 작용과 미생물 흡착에 의해 이루어진다고 보고된 바 있다. 특히 백색부후균(White rot fungi)는 각종 난분해성 물질을 비특이적으로 분해할 수 있는 리그닌 분해 효소를 생산하는 것으로 보고되었다.^{8,9)}

본 연구에서는 난분해성 염색폐수의 생물학적 처리에 대한 기초 연구로서 난분해성물질인 염료를 분해할 수 있는 생물학적 처리에 응용 가능한 미생물을 선별 및 분리하고자 하였다.

II. 실험 재료 및 방법

1. 사용 염료

본 연구에서 사용한 염료는 반응성 염료인 Reactive Orange 16(RO-16), Reactive Blue 19(RB-19), Reactive Blue 49(RB-49), Reactive Yellow 145(RB-145) 4종

[†]Corresponding author : College of Environment & Safety Engineering, Hoseo University
Tel: 82-41-540-5741, Fax: 82-41-540-5748
E-mail : jhlee@office.hoseo.ac.kr

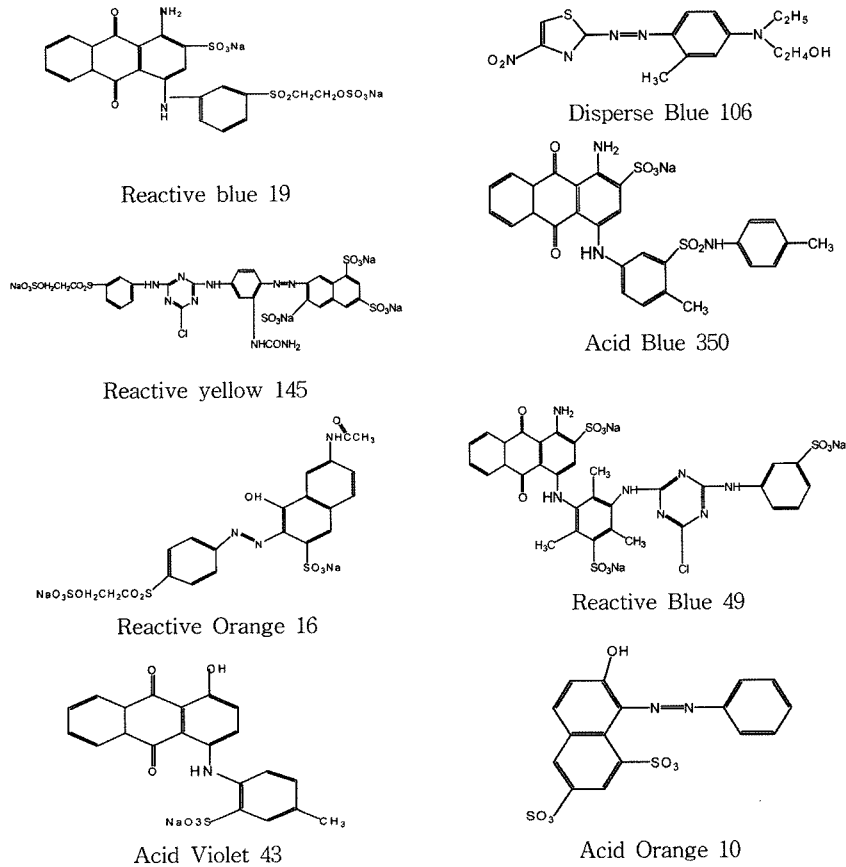


Fig. 1. Chemical structures of representative dyes.

과 산성염료인 Acid Orange 10(AO-10), Acid violet 43(AO-43), Acid Blue 350(AB-350) 3종, 분산성 염료인 Disperse blue 106(DB-106) 1종을 사용하였으며, 총 8가지 염료에 대하여 색도계 시험을 실시하였다. 본 실험에서 사용한 염료 총 8종에 대한 화학구조식은 Fig. 1과 같다.

2. 균의 분리 및 보존

염색폐수처리시설의 생물학적 처리조를 거친 염색 폐수로부터 활성이 높은 미생물을 분리하기 위해 시료를 포기 배양하면서 7일 간격으로 시료를 100 ml씩 취하여 Reactive Blue 19와 Reactive Yellow 145를 각각 100 ppm 첨가하여 반연속 배양을 실시하였다. 배양된 시료를 희석(103-105)하여 염료가 첨가된 MGYM (Modified Glucose Yeast Extract Medium; 2.0 g glucose, 1.0 g yeast extract, 0.14 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5 g KH_2PO_4 , 1.0 g K_2HPO_4 , 0.4 g NaCl, 2% agar) 고체배지에 0.1 ml를 도말한 후 $30 \pm 1^\circ C$ 에서 10일간

배양하였다. 배지에서 색도가 제거된 부분의 콜로니를 취하여 순수분리를 위해 여러 차례의 고대 배양을 실시한 후 Potato Dextrose Agar(PDA) 사면배지에 배양하여 $4^\circ C$ 에서 보관하면서 필요시 계대하여 사용하였다.

3. ITS(Internal Transcribed Spacers) sequencing

1) PCR amplification

균체의 확보를 위해 PDA 배지에 멸균된 cellophane membrane을 깔고 균을 접종하여 $25^\circ C$ 에서 3~4일간 배양하였다. 배양된 균을 1.5 ml microtube에 모았고 여기에 100 μl 의 STES buffer(500 mM NaCl, 200 mM Tris-HCl(pH 7.6), 10 mM EDTA, 1% SDS)와 glass beads를 첨가하여 TOMY micro tube mixer(TOMY, Seiko, Japan)를 이용하여 20분간 mix한 후 200 μl 의 TE buffer(pH 8.0)를 첨가했다. 이를 동량의 phenol/chloroform/isoamyl alcohol extraction(25:24:1) 용액으로 추출한 다음 RNase A(20 mg/ml) 5 μl 를 첨가하여 $37^\circ C$ 에서 20분간 배양한 후 0.1 volume의 3 M sodium

acetate과 2 volume의 cold 95% ethanol로 DNA의 침전을 유도하였다. 이를 70% 에탄올로 세척 후, 진공 건조한 다음 50 µl의 증류수에 녹였다.

PCR 증폭은 10 pmol의 각각의 primer, 250 M dNTP, 10 mM Tris-HCl(pH 9.0), 40 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 2 U의 *Taq*-DNA polymerase(Bioneer, Korea) 및 100 ng의 template DNA를 첨가하여 최종 volume을 50 µl로 조정하였다. DNA 증폭은 initial denaturation을 94°C에서 3분간 실시하고 denaturation 40초(94°C), annealing 40초(55°C), extension 1분(72°C)으로 30 cycle을 실시한 뒤 final extension을 72°C에서 15분간 실시하였다.

본 실험에서는 사용한 primer는 ITS5(5'-GGAAGT AAAAGTCGTAACAAGG-3'), ITS4(5'-TCCTCCGCT TATTGATATGC-3')를 이용하여 ITS 영역을 증폭하였다.

2) 유전자 서열 분석

PCR 산물은 Wizard PCR prep kit(Promega, Madison, WI, USA)로 정제하고, BigDye terminator cycle sequencing kits(Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A.)을 이용하여 sequencing 반응을 하였고, 반응에는 PCR 반응에 사용한 동일한 primer를 사용하였다. Gel 전개 및 염기서열 분석에는 ABI Prism 310 Genetic analyzer(PE Applied Biosystem)를 이용하였다. National Center for Biotechnology Information(NCBI)의 Basic Local Alignment Search Tool(BLAST)를 이용하여 DNA 데이터베이스와 유사한 염기서열을 비교하여 각각을 동정하였다.

4. 색도 제거능력 측정

1) 고체배지

PDA 배지에서 전배양한 분리 균주를 1×1 cm의 정사각형으로 잘라 100 ppm 농도로 염료가 포함된 MGYM 고체배지의 중앙에 놓고 배지 상에서의 탈색된 영역의 지름을 기준으로 측정하였다. 탈색된 영역의 중심을 직교하는 수직선과 수평선을 평판배지의 밑면에 유성 펜으로 그려 5일 경과되었을 때 종축 및 횡축의 직경을 측정한 후 두 값을 평균하여 탈색 영역의 직경으로 정하고 탈색영역의 면적을 구하여 전체 평판의 면적에 대한 퍼센트 비율로 나타내었다.

2) 액체배지

염료를 함유한 평판 배지에서의 균사체 성장 및 염료 색도 제거능력이 우수한 것으로 판별된 균주를 8가지 염료가 각각 포함된 MGYM 액체배지에 접종하여 30 ± 1°C에서 150 rpm으로 5일 교반 배양하였다. 색도 분

해 능력의 확인은 배양액 1 ml를 원심분리(4000 rpm, 10분)한 다음 상등액의 흡광도를 측정(UVmini 1240)하여 확인하였다. 측정된 흡광도를 Standard curve와 비교하여 배지내의 염료의 농도를 산정하였다. 또한 염료내의 색도 제거력을 확인하기 위하여 다음 식을 적용하여 색도가 제거된 것을 퍼센트로 나타내었다.

$$Decolorization(\%) = \frac{(I - F)}{I} \times 100 \quad (1)$$

I = absorbance of initial medium.

F = absorbance of decolorized medium.

III. 결과 및 고찰

1. 색도제거 미생물의 분리

색도제거 활성이 있는 집락으로부터 형태적 특성과 색동에 따라 Bacteria 13주와 3종의 곰팡이를 1차로 선별한 후 색도제거에 대한 고체배지상의 효과가 가장 뛰어난 1종의 백색부후균을 선정하여 HUE05-1로 명명하여 본 실험에 사용하였다. HUE05-1의 PDA 배지에서의 집락형성 특징과 현미경적 특성은 각각 Fig. 2와 3과 같았다.

2. ITS sequencing 결과

분리된 백색부후균 HUE05-1의 ITS sequencing의 염기서열은 Fig. 4와 같다. 이를 BLASTN 프로그램을 이용하여 GENE BANK와 RDP(RNA database project)에서 확인한 결과 색도제거 능력이 큰 HUE05-1 균주는 기존의 알려지지 않은 새로운 균주로서 *Bjerkandera adusta*와 87.7% 정도 유사하지만(Fig. 5) 기존의

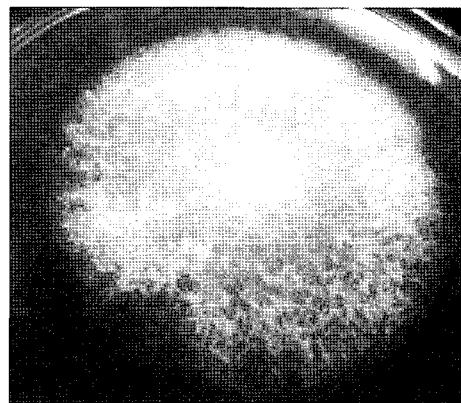


Fig. 2. Colony morphology of HUE05-1 isolated in textile wastewater (PDA-medium, 30°C, 72 h).

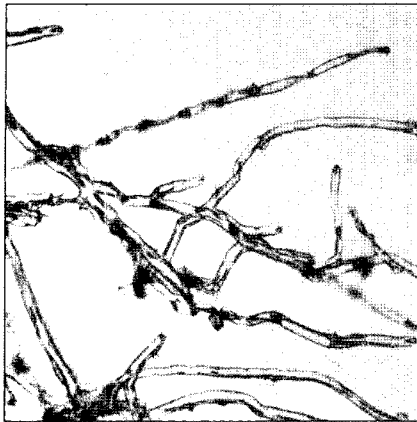


Fig. 3. Photographs of HUE05-1 isolated from textile wastewater (PDA-medium, 30°C, 72 h, light microscope, 1000X).

>HUE05-1

GTTACAGGGGTAGTCCTACCTGATTGAGCTCAGAGTTCAGATGTATTGT
 CCCGTGAAGCGGTTAGAAGCGCGTACTTCACATACCANTCGANGGCAGN
 GCAGATAATTATCAGCTGAAGCGACCGGTAACGTCGCCACTAATGCATT
 TCAGAGGAGTCGACTCGCGAGAGCCGACACGACCTCCAAGTCCAAGCCTT
 GCAGTAACAAAACGTAAAGCTTGAGAATCCATGAGACTCAAACAGGCAT
 GCTCCTCGGAATACCAAGGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATT
 CACTGAATTCGCAATTCACATTACTTATCGCATTTCGATGCGTTCCTCA
 TCGATGCGAGAGCCAAGAGATCCGTTCGCTGAAAGTTGTATATAGTTGCGT
 TATCCGCAAAATAAGACATTCATAACTGAAGCGTTTGTAGTAAGATAAC
 ACCTACAAGTGCACGCGATATCAGACGTACGTACTAGCCGCGAAGCCAGC
 CTCGTCACAAAAGCCANCCTTACATGCGATATGTGCACAGAAGTTGAGAG
 TGGATGAGANTAGGTGTGCATCATGCCCTTGGCGGCAGCAACAACCTNACC
 AAAANCTCGATAATGTCCTCCCGGATTATCAATAAGCGGAGG

Fig. 4. The ITS sequence of isolated HUE05-1.

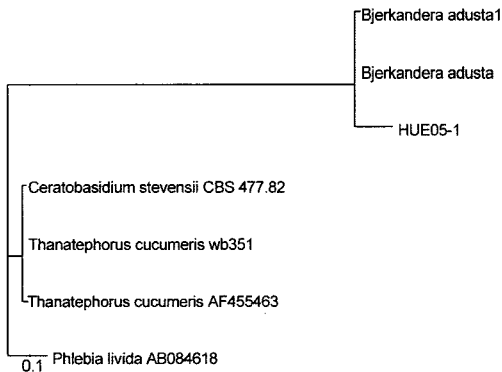


Fig. 5. Neighbor-joining tree based on ITS sequences.

*Bjerkandera adusta*와는 다른 새로운 종인 균주로 판별되었다.

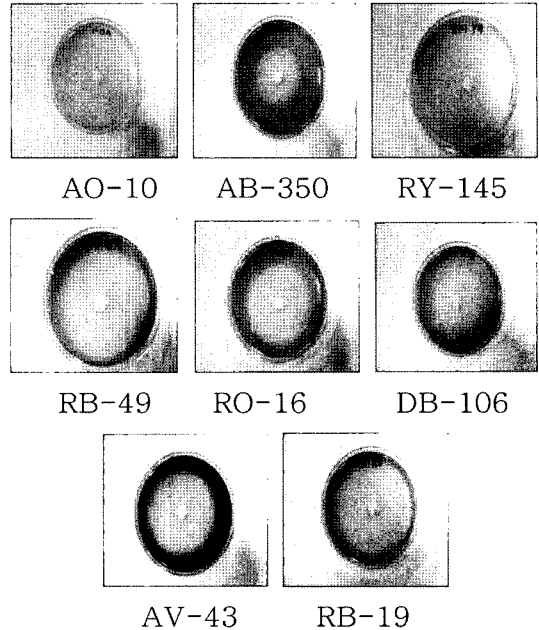


Fig. 6. Decolorization effect of synthetic dyes by HUE05-1 (After 3 day, 30°C).

Table 1. Decolorization of various dyes by HUE05-1

Dyes	1 day	2 day	3 day	4 day
AO10	33%	63%	86%	100%
DB106	35%	66%	78%	100%
AV43	32%	59%	80%	100%
AB350	25%	45%	51%	63%
RO16	26%	59%	74%	100%
RB49	30%	61%	81%	100%
RY145	18%	61%	68%	91%
RB19	32%	61%	71%	100%

3. 색도 제거능력 측정 결과

1) 고체배지

분리된 백색부후균 HUE05-1 균주를 100 ppm 농도로 염료가 포함된 MGYM 고체배지에 접종하여 색도 제거시험을 한 결과를 Fig. 6에 나타내었다.

Table 1에서와 같이 AO10, DB106, AV43, RO16, RB49, RB19 염료는 4일 만에 100% 색도제거 효과를 나타내어 분리된 백색부후균 HUE05-1의 색도 제거효율이 매우 우수하였다. AB350와 RY145 염료에서도 각각 61%, 91% 색도제거율을 보임으로서, 분리된 균주를 이용하여 지속적인 실용화 개발을 한다면 산업폐수처리 분야에 기술적, 경제적 효용성을 높일 수 있는 가능성이 있는 결과를 얻었다.

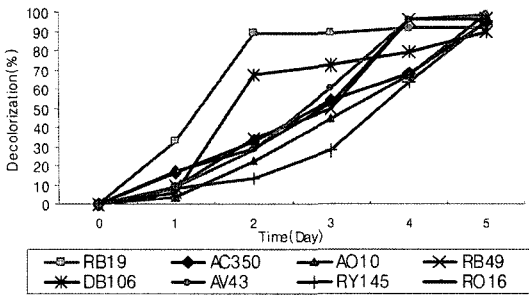


Fig. 7. Decolorization of various dyes by HUE05-1 at different day.

2) 액체배지

염료의 색도제거 능력 확인결과 HUE05-1 균주가 전체 액체배지에서 90% 이상의 높은 색도제거 효과를 나타내었으며(Fig. 7), 교반과정에 의한 산소공급으로 색도제거가 잘 이루어진 것으로 생각된다.

IV. 결 론

본 연구는 난분해성 염색폐수의 생물학적 처리에 대한 연구가 주목을 받고 있는 상황에서 생물학적 처리가 가능한 균주의 획득과 색도제거를 목표로 염색폐수로부터 색도 제거능이 우수한 백색부후균을 분리하였다.

분리된 HUE05-1 균주의 ITS sequencing의 염기서열을 BLASTN 프로그램을 이용하여 GENE BANK 와 RDP(RNA database project)에서 확인한 결과 HUE05-1 균주는 87.7%만 유사하게 나타난 기존의 *Bjerkandera adusta*와는 다른 새로운 색도제거능력이 있는 균주일 가능성이 큰 것으로 조사되었다.

고체배지상의 색도 제거 능력 측정결과 실험에 사용된 대부분의 염료는 4일 안에 100% 색도제거 효과가 나타났으며, 액체배지에서는 90% 이상의 높은 색도제거 효과를 보였다.

감사의 글

이 논문은 2005학년도 호서대학교 학술연구조성비에 의한 연구 결과이며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Pak, D. and Chang, W. : Decolorization dye wastewater with low temperature catalytic oxidation. *Water Science and Technology*, **40**, 115-121, 1999.
2. Slokar, Y. M. and Le Marechal, A. M. : Methods of decolorization of textile wastewater. *Dyes and Pigments*, **37**, 335-356, 1997.
3. Pelegrini, R. P., Reralto-Zamora, A., Andrade, R., Reyers, J. and Duran, N. : Electrochemically assisted photocatalytic degradation of reative dyes. *Applied Catalysis B:Environmental*, **22**, 83-90, 1999.
4. 박영식, 안갑환 : 응집, 오존 및 UV 후처리가 염색폐수의 COD와 색도 제거에 미치는 영향. *한국환경위생학회지*, **27**(4), 93-98, 2001.
5. 박영식, 안갑환 : Pilot 혐기-호기 공정을 이용한 염색폐수의 생물학적 처리. *한국환경위생학회지*, **27**(3), 11-20, 2001.
6. Tan, N. C. G., Lettinga, G. H. and Field, J. A. : Reduction of the azo dye mordant orange 1 by methanogenic granular sludge exposed to oxygen. *Biore-source Technology*, **67**, 35-42, 1999.
7. Koichi, H., Yoshio, W. and Kazunori, N. : Decolorization of azo dye by the white-rotbasidiomycete *Phanerochaete sordida* and its manganese peroxidase. *Journal Society for Bioscience and Bioengineering*, **95**, 455-459, 2003.
8. Yuzhu, Fu. and Viraraghavan, T. : Fungal decolorization of dye wastewater. *Biore-source Technology*, **79**, 251-262, 2001.
9. Shin, J. C., Choi, K. K., Jeon, H. H., Kim, S. Y. and Lee, J. W. : Microbe isolation and optimization for the decolorization of reactive dye. *Korean Journal Biotechnology and Bioengineering*, **19**(3), 200-205, 2004.