

## 염료의 색도 제거를 위해 개발된 호알칼리성 미생물의 특성

이현욱<sup>1</sup> · 임동준<sup>†</sup>

<sup>1</sup>(주)윌텍, 영남대학교 공과대학 디스플레이화학공학부

### Charateristics of Akalophilic Microorganism Developed for Color Removal of Dye

Hyun Wuk Lee<sup>1</sup> and Dong Joon Lim<sup>†</sup>

<sup>1</sup>Willtech Co. Ltd., 305 Kyungil University R&DB Center, 33 Buhori, Hayangeup, Gyongsan 712-701, Korea  
School of Display and Chemical Engineering, Yeungnam University, 214-1 Daedong, Gyongsan 712-749, Korea

(Received: May 13, 2010/Revised: June 7, 2010/Accepted: June 16, 2010)

**Abstract**— An alkalophilic microorganism capable of degrading dyes was developed for the treatment of alkaline dye solution. This strain was identified as *Pseudomonas* species. Using this microorganism, biological treatment of dye was studied in Erlenmeyer flasks. The characteristics of this microorganism were observed under various incubating-condition such as temperature, pH, nitrogen source, and macronutrients concentration. The removal efficiencies of Disperse Red 60 from synthetic wastewater were 33.5 ~ 36.9% at the range of 30 ~ 40°C, and they were 31.1 ~ 36.7% at the range of initial pH 8 ~ pH 10, respectively. The optimal culture medium was found to be 0.25%(w/v) yeast extract, 0.25%(w/v) polypeptone, 0.1%(w/v) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.2%(w/v) MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, and 1.0%(w/v) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. In treatment of various dyes using Erlenmeyer flasks, the removal efficiencies of Disperse Blue 87, Disperse Yellow 64, Disperse Red 60, Acid Blue 193, Acid Red 138, and Direct Yellow 23 were found to be 76%, 71%, 58%, 93%, 94%, and 90% respectively after 24hrs reaction of alkalophilic strain *Pseudomonas* sp. YBE-12.

**Keywords:** dye degradation, color removal, alkalophilic microorganism, dye degrading strain, biotreatment of dye

### 1. 서 론

폴리에스테르 염색가공폐수는 다양한 화학약품이 함유되어 있어 처리하기 까다로운 산업폐수의 하나로 분류된다. 특히 감량가공공정 사용한 NaOH와 염색공정에 사용한 염료가 대량으로 폐수에 함유되어 배출되므로 강알칼리성이며 높은 색도를 가진다. 폴리에스테르 종합 염색가공폐수를 처리하기 위해서는 강알칼리성을 산으로 중화하여 색도를 제거하는 공정이 필요하다. 중화공정이 필요한 이유는 현재 방류수 수질기준이 중성영역이기 때문이기도 하지만, 주처리공정인 생물학적 처리공정에서 현재 사용하는 미생물군이 중성영역에서 활성을 가지는 미생물들로 구성되어 있으므로, 폴리에스테르 염색가공폐수가 생물학적 처리공정으로 유입되기 전에 중화되지 않으면 생물학적 처리가 불가능하기 때문이다.

현재 사용되는 염색폐수 처리공정은 중화공정, 응집침전공정, 화학적 산화공정, 활성오니공정이 대표적인데 이러한 처리공정들을 적절히 복합적으로 사용하고 있다. 그러나 이렇게 여러 가지 공정을 사용하므로 대규모 처리시설과 넓은 부지가 필요하며, 유지관리가 어렵고, 운전이 복잡하며,약품비, 전력비, 2차폐기물처리비 등 처리비용이 많이 필요하다는 단점이 있다. 그러므로 처리시설이 단순하고 간단하며, 유지관리가 쉽고, 처리비용이 저렴한 처리공정의 개발이 시급한 실정이다.

생물학적 방법으로 염색폐수를 처리하는 연구에는 염료를 제거하는 미생물에 대한 연구에서부터 실제 염색폐수의 색도 제거를 위한 공정 개발에 이르기까지 다양한 연구가 이루어지고 있다. 염료 제거 미생물에 대한 연구에서는 백색 부후균을 이용한 염료의 생분해에 대한 연구<sup>1,2,3)</sup>, *Pseudomonas* sp.에 의한 azo계 염료의 분해에

<sup>†</sup>Corresponding author. Tel.: +82-53-810-2527; Fax.: +82-53-810-4631; e-mail: djlim@ynu.ac.kr

대한 연구<sup>4,5)</sup>, azo reductase에 의한 azo계 염료의 분해 mechanism에 대한 연구, algae에 의한 염료분해 연구<sup>6)</sup>와 actinomycetes에 의한 염료분해에 대한 연구<sup>7,8)</sup>가 있었다. 이들 연구에서는 중성영역에서 활성을 띠는 미생물을 이용하였다. 물리적 또는 화학적인 염료의 제거 방법으로는 활성탄 등을 이용한 흡착법<sup>9)</sup>, 과산화 수소(Fenton's reagent), 염소 및 오존을 이용한 산화법<sup>10,11)</sup>, 고분자막을 이용한 분리법등이 있었다.

실제 염색폐수는 여러 가지 공정을 병합하여 사용하는데 이에 대한 연구로는 활성탄 공존 활성오니법(PACT), 펜톤법에 의한 처리후 막분리를 사용한 염색폐수 처리에 대한 연구, 산소 활성슬러지 처리, 응집처리를 거친후 UF막 분리에 의한 염색폐수 처리에 대한 연구등이 있었다. 이들 연구들 중에서 생물학적 처리 분야는 중성 미생물을 중심으로 연구가 이루어져있어, 실제 알칼리성 염색가공폐수 처리에 이 연구들을 활용할 때는 중화공정을 설치해야 하는 문제점이 있다.

알칼리성 염색가공폐수를 처리하기 위해 생물학적 처리공정에 호알칼리성 미생물을 사용하면 상기에 지적한 문제점들을 모두 해결할 수 있다. 호알칼리성 미생물들은 알칼리 조건에서 활발하게 생육을 하며, 발아 및 성장에  $Na^+$  ion이 필요하고, 세포성장중에 주변 환경의 pH를 세포성장에 적합한 pH로 변환시키는 특성이 있다고 보고된<sup>12,13)</sup> 바 있다. Polyester 염색가공폐수는 강알칼리성이고 NaOH를 대량으로 함유하고 있으므로 호알칼리성 미생물이 성장하기에 적합하다. 강알칼리성 염색폐수를 호알칼리성 미생물로 처리하면 이 미생물이 염색폐수의 pH를 중성에 가깝게 조절할 수 있어 중화공정을 생략할 수 있다.

본 연구에서는 기존의 polyester 염색가공폐수의 처리공정으로부터 중화과정을 생략할 수 있는 방안 개발의 일환으로, 강알칼리성 영역에서 색도를 제거하는 호알칼리성 미생물을 개발하고, 개발한 호알칼리성 미생물의 특성과 염료에 대한 색도제거효율에 대해 조사하고자 한다.

## 2. 실험

### 2.1 염료제거 균주 개발

토양, 하천수 등의 시료를 채취하여 염료가 포함된 배지에 접종하여 배양한 다음 염료농도

가 낮아진 배지에서 미생물들을 순수분리 하였다. 순수분리한 미생물들을 염료가 포함된 배지에 각각 24시간 배양하여 가장 염료농도가 가장 낮아진 배지에서 배양한 균주를 선발하였다.

### 2.2 균주의 관찰 및 동정

주사전자현미경(SEM)(Hitachi, S-4300)을 사용하여 선발한 염료제거 미생물의 형태를 관찰하였고, 미생물의 동정은 한국과학기술원 생명공학연구소 유전자원센터 유전자은행에 의뢰하였다.

### 2.3 균주 특성에 따른 배양조건 설정

염료제거균주 분리에 사용한 배지의 조성은 증류수 1L에 대해 yeast extract 0.25%(w/v), peptone 0.25%(w/v),  $KH_2PO_4$  0.1%(w/v),  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.02%(w/v),  $Na_2CO_3$  1.0%(w/v)로 하였고, 액체배지에는 여기에 염료를 100mg/L 되게 넣고, 고체배지에는 여기에 염료를 1,000mg/L 되게 넣고 agar powder를 1.5%(w/v)추가하였다. 배양액의 초기 pH는 10이었으며, 배양온도를 35°C로 하여 염료제거 균주를 선발하였다.

선발한 균주를 염료제거와 균주성장에 대한 특성조사는 250ml용 Erlenmeyer flask에 50ml의 액체 배지를 넣고 균주를 접종한 후 회분식으로 배양하면서 수행하였다.

염료제거 및 균주성장을 위한 최적온도, 최적초기 pH와 배지성분 각각의 최적함량 등을 조사하였다.

### 2.4 균주성장과 염료제거효율 분석방법

균체의 성장은 일정량의 sample를 증류수로 10배 희석한 후 UV-VIS. spectrophotometer(Pharmacia Biochrom 4060)를 이용 660nm에서 흡광도를 측정하였다.

염료제거효율은 배양액 1ml를 취하여 n-butanol 4ml와 혼합한 다음 두 액의 상이 완전히 구분이 될 때 상등부의 butanol층만을 취하여 원심분리 후 염료의 특정 peak가 나타나는 파장에서 흡광도를 측정하였다. 염료는 각기 특성 peak를 나타내는 파장이 있는데 각 염료들의 특성 파장에서 흡광도와 염료의 양에 대한 calibration curve를 작성하고 이것을 염료농도 분석에 이용하였다.

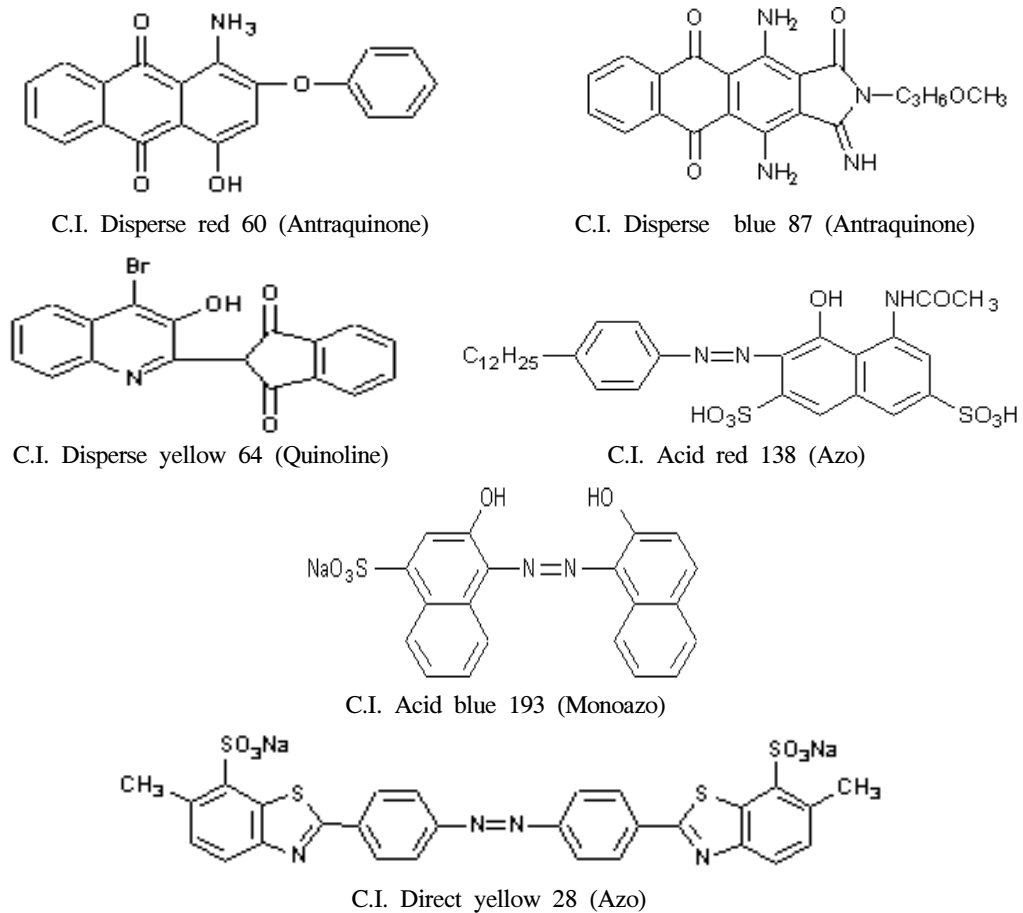


Fig. 1. Chemical structure of dyes.

## 2.5 회분식 색도제거에 사용한 염료

선발한 알칼리성 균주를 이용하여 회분식으로 6종류의 염료를 사용하여 색도제거 실험을 하였다. 이들 염료중의 3종류는 분산염료인 Disperse Red 60(antraquinone 계), Disperse Blue 87 (antraquinone 계), Disperse Yellow 64(quinoline 계)이고, 나머지 3종류는 수용성염료인 Acid Red 138(azo 계), Acid Blue 193(monoazo 계), Direct Yellow 28(azo 계)이다. 상기 6종류 염료의 구조식을 Fig. 1에 나타내었다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1 염료제거 균주 개발

토양, 하천수 등의 시료를 멸균 증류수에 현탁시킨 후 현탁액을 Disperse Red 60이 100mg/L 되게 포함된 액체배지에 접종하고 35°C에서 배양한 다음 각 액체배지의 염료농도를 측정하여 이 중 염료농도가 낮아진 액체배지의 배양액을

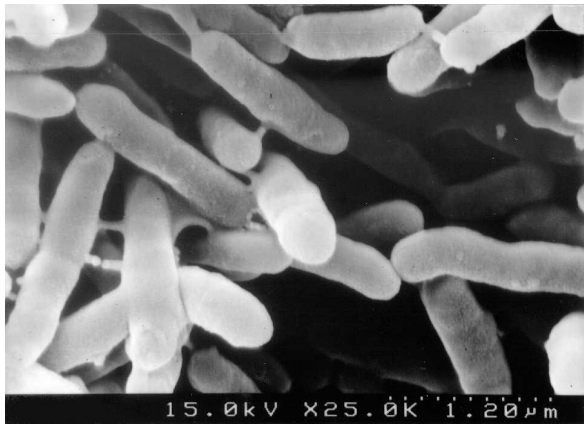
Disperse Red 60이 포함된 고체배지에 도말하고 배양하였다. 고체배지에서 성장한 미생물들중 주위에 clear zone이 형성된 colony를 선택하여 계대배양을 통해 순수 분리하였다. 이와 같은 방법으로 염료제거능을 가진 미생물 10종류를 Disperse Red 60이 포함된 액체배지에 각각 접종하고 35°C에서 24시간 배양한 다음, 배양액의 초기 염료농도와 24시간 배양 후 염료농도를 측정하여 염료제거효율을 계산하여 Table 1에 나타내었다. Table 1에서 보는 바와 같이 염료를 가장 많이 제거시킨 균주번호 4를 염색폐수의 색도제거 연구 및 실험을 위한 균주로 최종 선발하였다.

### 3.2 염료제거 균주의 동정

선발한 균주를 25,000배 확대한 SEM 사진을 Fig. 2에 나타내었으며, 동정결과를 Table 2에 나타내었다. Fig. 2에서 보면 균주의 형태는 rod 형이었고, 편모(flagella)가 없었으며, 표면은 매끄러웠다.

**Table 1.** Color removal efficiency of strains isolated for decolorization of dyeing process wastewater after 24hrs of reaction in Erlenmeyer flask

|                              |      |      |      |      |      |       |       |
|------------------------------|------|------|------|------|------|-------|-------|
| Stains                       | AY   | DY-1 | DY-2 | A-1  | B    | C-1   | C-3-1 |
| Color removal efficiency (%) | 23.9 | 22.3 | 19.3 | 19.8 | 18.3 | 12.7  | 15.7  |
| Stains                       | 1-1  | 1-2  | 2-1  | 4    | 5-1  | 5-2-1 | 5-5-2 |
| Color removal efficiency (%) | 12.7 | 20.8 | 20.8 | 39.1 | 30.0 | 23.9  | 27.9  |



**Fig. 2.** Scanning electron micrograph of *Pseudomonas* sp. YBE-12 ( $\times 25,000$ ).

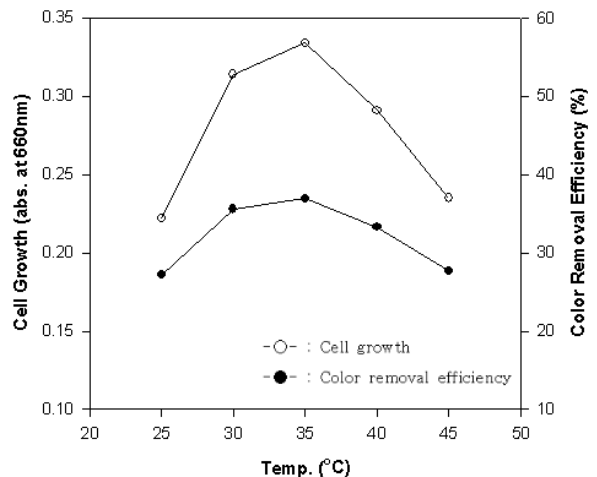
**Table 2.** Morphological and physiological characteristics of *Pseudomonas* sp. YBE-12 for dye removal

| Morphological Characteristics |                                  |
|-------------------------------|----------------------------------|
| Cell shape                    | Rod                              |
| Cell size                     | 0.2~0.3 $\times$ 1.5~2.0 $\mu$ m |
| Spore                         | Negative                         |
| Gram stain                    | Negative                         |
| Flagella                      | None                             |
| Motility                      | Negative                         |
| Brilliance                    | Glistening                       |
| Physiological Characteristics |                                  |
| Oxidase reaction              | Positive                         |
| Catalase reaction             | Positive                         |
| Quinone composition           | Ubiquinone-9                     |

Table 2에서 보는 바와 같이 염료제거 균주는 Gram stain은 음성을 보였으며, oxidase와 catalase는 양성반응을 보였고, quinone 조성은 ubiquinone-9인 *Pseudomonas* sp.로 판명되었으며, 이 균주를 *Pseudomonas* sp. YBE-12로 명명하였고, YBE-12로 약칭하였다.

### 3.3 염료제거 균주의 온도에 따른 특성조사

온도가 미생물의 성장과 염료 제거에 미치는 영향을 알아보기 위해, Disperse Red 60이 포함된 배지에 YBE-12를 접종하고 배양온도를 25 $^{\circ}$ C에서 45 $^{\circ}$ C까지 5 $^{\circ}$ C간격으로 조정하여 24시간 회분식으로 배양한 다음 각 배양온도에서 균주성장과 염료제거효율을 측정하여 Fig. 3에 나타내었다. Fig. 3에서 각각의 배양온도에 대한 염료제거효율을 보면 배양온도 25 $^{\circ}$ C에서 염료제거효율은 27.2%, 30 $^{\circ}$ C에서 염료제거효율은 35.6%, 35 $^{\circ}$ C에서 염료제거효율은 36.9%, 40 $^{\circ}$ C에서 염료제거효율은 33.3%였으며 배양온도 45 $^{\circ}$ C에서 염료제거효율은 27.7%였다. 균주성장과 염료제거를 위한 최적 배양온도는 35 $^{\circ}$ C였고, 30~40 $^{\circ}$ C의 넓은 온도범위에서 우수한 염료제거효율을 보였으며, 실험에 적용한 온도범위 내에서 균주성장과 염료제거가 모두 이루어졌다. 실제 현장의 염색폐수처리장에 유입되는 종합 염색폐수의 수온은 통상 30 $^{\circ}$ C를 넘으며 계절과 기후에 따라 온도변화가 심하고 여름철에는 수온이 약 40 $^{\circ}$ C까지 된다.



**Fig. 3.** Effect of temperature on cell growth and color removal efficiency after 24 hrs of reaction in batch culture.

그러므로 종합염색폐수의 처리를 위해 사용하는 균주는 고온에 대한 내성이 있어야 하며 온도변화에 비교적 잘 적응하여야 한다. 그러한 점에서 YBE-12는 넓은 온도범위에서 염료 제거가 이루어졌으므로 종합염색폐수의 색도 제거에 사용할 수 있는 적절한 균주인 것으로 사료된다.

### 3.4 염료제거 균주의 pH에 따른 특성 조사

미생물의 성장과 염료제거가 가장 잘 이루어지는 초기 pH를 알아보기 위해, yeast extract 0.25%(w/v), polypepton 0.25%(w/v),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1%(w/v),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.02%(w/v)와 Disperse Red 60이 0.01%(w/v) 포함된 액체배지에  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 를 첨가하여 초기 pH를 조절하였으며 pH6 ~ pH11범위내에서 pH를 1씩 변화시킨 배양액을 만들었다. 여기서 초기 pH8은  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.09(w/v), 초기 pH9은  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.20(w/v), 초기 pH10은  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1.00(w/v), 초기 pH11은  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2.20(w/v) 되게 첨가하여 조절하였으며, 초기 pH6과 초기 pH7은 황산용액을 소량 첨가하여 조절하였다. 이 배양액 50ml를 각각 250ml용 Erlenmeyer flask에 넣고 YBE-12를 접종하여 35°C에서 24시간 회분식으로 배양하여 미생물 성장과 염료제거효율을 조사하였으며, 이 결과를 Fig. 4에 나타내었다. Fig. 4에서 보면 초기 pH6에서 24시간 배양한 후 염료제거효율은 10.2%, 초기 pH7에서 염료제거효율은 10.5%, 초기 pH8에서 염료제거효율은 31.1%, 초기 pH9에서 염료제거효율은 32.7%, 초기 pH10에서 염료제거효율은 36.7%였고 초기 pH11에서 염료제거효율은 13.3%였다. 가장 우수한 미생물 성장과 염료제거효율을 보여준 초기pH는 pH10이었으며, 초기 pH8과 초기 pH9에서 염료제거효율은 31%이상으로 우수하였고, 반면에 초기 pH6, 초기 pH7, 초기 pH11에서는 염료제거효율은 13.3% 이하로 저조하였다. 초기 pH가 8,9,10인 알칼리성인 합성 염료용액에서 YBE-12가 우수한 염료제거효율을 보였다.

한편, Fig. 4에서 보면  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 를 첨가하지 않은 pH6 과 pH7에서는 세포 성장이 저조하였으며, pH8, pH9, pH10에서는 세포 성장이 활발하였는데, pH를 조절하기 위해 pH10에 첨가된  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 의 농도가 pH8에 첨가된  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 의 농

도에 비해 11배나 더 첨가하였는데도 불구하고 세포성장은 20%만 증가된 것을 볼 수 있다. pH6 과 pH7에서는 세포 성장이 저조한 것은 본 실험에 사용한 호알칼리성 균주가 세포성장에는  $\text{Na}^+$ 가 필요하다는 Koki Horikoshi의 보고된<sup>12,13)</sup>와 비슷한 경향을 보였으며, pH8, pH9, pH10에서는 첨가된  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 의 농도가 크게 차이가 남에도 불구하고 성장된 세포농도는 큰 차이가 없이 증가되었으며, pH11에서는  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 의 농도가 크게 증가되었음에도 불구하고 세포농도는 크게 감소된 것을 볼 수 있다. 이는 세포성장에는  $\text{Na}^+$ 는 필요하나 첨가된  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 의 농도가 세포 성장에 비례하지 않음을 볼 때 개발된 호알칼리성 색도제거 균주가 세포 성장에 필요한 최소한의  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 농도 이상에서는 첨가된  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 의 농도에 영향을 받지 않고 pH에 영향을 받은 것으로 사료된다.

이번에는 상기조건과 동일하게 하여 30시간 동안 배양하였을 때, 각 초기 pH에서 배양시간에 따른 배양액의 pH 변화를 알아보기 위해 6시간 간격으로 pH를 측정하여 그 결과를 Fig. 5에 나타내었다. Fig. 5에서 보면 실험한 모든 초기 pH 범위에서 배양시간의 흐름에 따라 pH의 변화가 꾸준히 나타났다. 배양 30시간에서 변화된 최종 pH를 보면, 초기 pH6과 초기 pH7은 pH6.5와 pH6.9로, 초기 pH8과 초기 pH9는 pH8.2와 pH8.5로, 초기 pH10과 초기 pH11은 pH9.1과 pH9.5로 각각 변화했다.

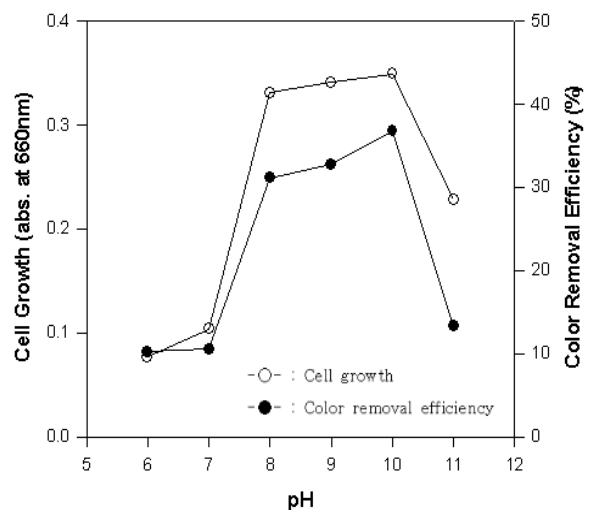


Fig. 4. Effect of initial pH on cell growth and color removal efficiency after 24hrs of reaction in batch culture.

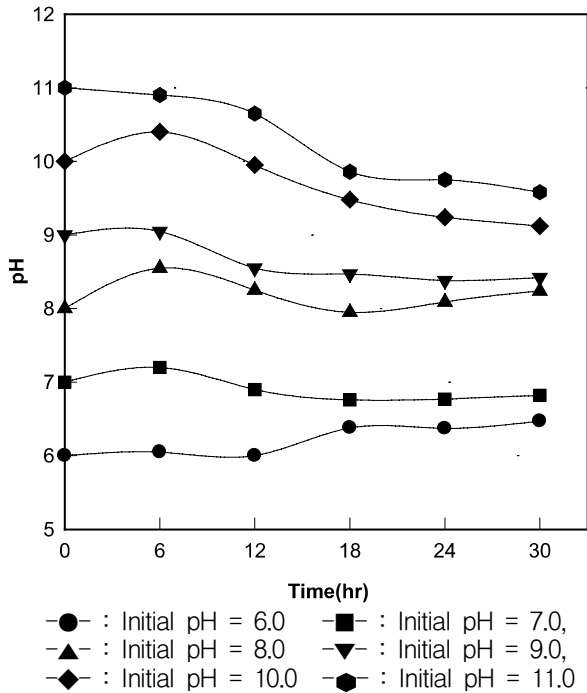


Fig. 5. Time course behavior of pH at various initial pH in 250ml Erlenmeyer flask.

pH가 가장 많이 변한 초기 pH는 pH11이었으며 pH가 가장 적게 변한 초기 pH는 pH8이었다. 초기 pH6인 약산성인 경우 배양시간이 경과함에 따라 pH가 조금 높아지는 경향을 볼 수 있으며, 초기 pH가 9,10,11인 알칼리성인 경우 배양시간이 경과함에 따라 pH가 점차 낮아지는 경향을 볼 수 있는데, 이는 호알칼리성 미생물이 주변환경의 pH를 균주성장에 적합한 pH로 변화시키는 능력이 있다는 연구보고<sup>13)</sup>와 일치되는 현상으로 판단된다.

Fig. 4와 Fig. 5의 결과들로 부터 염료제거 균주 YBE-12는 알칼리성 영역에서 염료제거효율이 우수하였으며, 초기 pH9, pH10, pH11의 염료 용액에 이 균주를 배양하였을 때 배지의 pH가 낮아지는 것을 볼 수 있었다.

이 결과들을 고찰해 보면 염료제거 균주 YBE-12는 강알칼리성의 염색폐수를 중화공정 없이 바로 처리할 수 있으며, 처리수의 pH도 법적규제치(pH5.8~8.6)의 상한선인 pH8.6에 가깝게 내려가므로 최종 방류전에 필요에 따라 약간의 중화처리만 해 주면 될 것이므로 기존의 polyester 염색가공폐수처리의 중화공정에 사용하는 황산의 소모량을 대폭 줄일 수 있을 것으로 판단된다.

### 3.5 염료제거균주의 다량영양소(macronutrients)에 따른 특성조사

염료제거균주 YBE-12의 균주성장과 염료제거효율에 미치는 질소원의 영향을 알아보기 위해 균주 분리에 사용한 배지의 조성에서 질소원을 다르게 하여 회분식으로 35°C에서 24시간 배양한 다음 균주의 성장과 염료제거효율을 조사하고, 그 결과를 Table 3에 나타내었다. 질소원은 12종류를 사용하였으며, 이 중 5종류의 질소원은 유기 질소원과 무기 질소원을 1:1로 혼합하여 사용하였고 7종류의 질소원은 유기 질소원 또는 무기 질소원을 단독으로 사용하였다. 각각의 질소원의 함량은 배지용액의 용량에 대해 0.5%(w/v)가 되게 하였다. Table 3에서 보는 바와 같이 가장 우수한 염료제거효율을 보여준 배지는 yeast extract와 polypeptone을 혼합한 질소원을 사용한 배지였으며 이 배지에서 YBE-12를 24시간 배양하였을 때 염료제거효율은 46%였다. 각각의 질소원에 대한 염료 제거효율을 살펴보면 24시간 회분식 배양 후 yeast extract를 사용한 배지에서 염료제거효율은 38%, polypeptone을 사용한 배지에서 염료제거효율은 23%, peptone을 사용한 배지에서 염료제거효율은 21%였으며, yeast extract + NaNO<sub>3</sub>를 사용한 배지에서 염료제거효율이 9%, polypeptone +

Table 3. Effect of nitrogen sources on cell growth and color removal efficiency after 24 hrs of reaction in batch culture

| Nitrogen sources  | Cell growth (abs.) | Color removal efficiency (%) |
|---|--------------------|------------------------------|
| Yeast extract   | 0.322              | 38                           |
| Polypeptone   | 0.243              | 23                           |
| Peptone   | 0.157              | 21                           |
| Casein  | 0.060              | 0                            |
| Urea  | 0.027              | 0                            |
| NaNO <sub>3</sub>   | 0.035              | 0                            |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                 | 0.026              | 0                            |
| Yeast extract + Polypeptone                                     | 0.337              | 46                           |
| Yeast extract + NaNO <sub>3</sub>                               | 0.182              | 9                            |
| Yeast extract + (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 0.054              | 0                            |
| Polypeptone + NaNO <sub>3</sub>                                 | 0.120              | 6                            |
| Polypeptone + (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>   | 0.034              | 0                            |

NaNO<sub>3</sub>를 사용한 배지에서 6%였으며 나머지 질소원에서는 염료가 제거되지 않았다.

질소원으로 yeast extract와 polypeptone을 혼합한 배지에서 세포 성장과 염료제거 효율이 가장 우수한 것은 yeast extract와 polypeptone이 복합배지로 대체적으로 세포 성장에 필요한 생장인자, 비타민, 호르몬, 미량원소를 공급할 수 있으므로 제한 배지에서보다 더 높은 균체수율을 얻을 수 있으며, 이로 인해 염료의 색도제거 효율도 증가된 것으로 사료 된다.

YBE-12의 분리배지에서 인원 및 칼륨원으로 사용한 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>의 농도에 따른 균주 성장과 염료제거 효율을 알아보기 위하여 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>를 전혀 첨가하지 않은 배지와 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>의 농도를 각각 0.05%(w/v), 0.1%(w/v), 0.2%(w/v), 0.3%(w/v), 0.4%(w/v), 0.5%(w/v)으로 달리 한 배지에서 YBE-12를 24시간 회분식으로 배양한 후 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>농도에 따른 균주 성장과 염료제거 효율을 조사하여 그 결과를 Fig. 6에 나타내었다. Fig. 6에서 보면 균주 성장과 염료제거가 가장 활발히 이루어진 배지의 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>농도는 0.1%(w/v)였으며, 이 농도에서 염료제거 효율은 46.1%였다. KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>농도 0.2%(w/v) 및 0.3%(w/v)에서 염료제거 효율은 각각 44.2% 및 42.7%였고, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>농도 0.05%(w/v) 및 0.4%(w/v)에서 염료제거 효율은 각각 33.6%와 31.5%로 양호한 결과를 보였으며, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 첨가되지 않은 배지와 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>농도가 0.5%(w/v)인 배지에서는 21.7%와 26.4%였다. 이 결과에서 염료제거균주 YBE-12의 균주 성장과 염료제거를 위한 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>농도는 0.1%(w/v)로 결정하였다.

염료제거균주 분리를 위해 사용한 배지에 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O의 농도가 YBE-12의 균주 성장과 염료제거 효율에 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위하여, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O를 첨가하지 않은 배지와 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 농도를 각각 0.01%(w/v), 0.02%(w/v), 0.03%(w/v), 0.04%(w/v), 0.05%(w/v), 0.07%(w/v), 0.10%(w/v)로 달리한 배지에서 YBE-12를 24시간 회분식으로 배양한 뒤 균주 성장과 염료제거 효율을 조사하여 그 결과를 Fig. 7에 나타내었다.

Fig. 7에서 보면 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 농도가 0.05%(w/v)까지 증가함에 따라 균주 성장과 염료제거 효율도 더 좋아졌다. 가장 우수한 염료제거 효율을

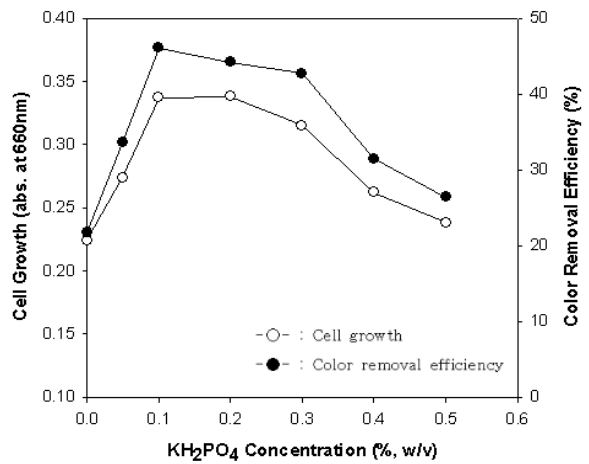


Fig. 6. Effect of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> concentration on cell growth and color removal efficiency after 24hrs of reaction in batch culture.

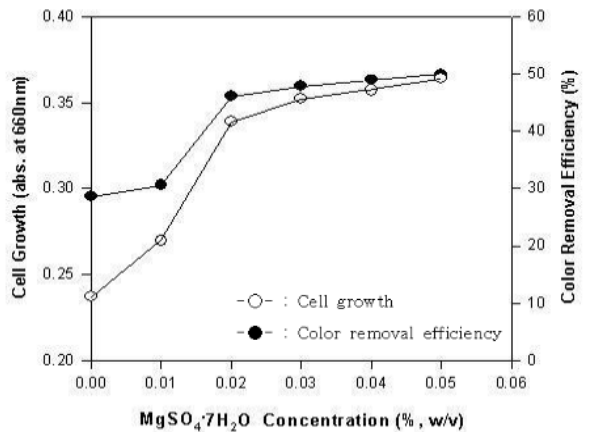


Fig. 7. Effect of MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O concentration on cell growth and color removal efficiency after 24hrs of reaction in batch culture.

보여준 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 농도는 0.05% (w/v)였고 이 농도에서 염료제거 효율은 50.0%였다. MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 농도 0.02%(w/v) ~ 0.04%(w/v)에서 염료제거 효율은 46.1% ~ 48.5%로 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 농도 0.05%(w/v)에서의 염료제거 효율과 크게 차이가 나지 않았으며, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O가 첨가되지 않은 배지와 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 농도 0.01%(w/v)인 배지에서 염료제거 효율은 각각 28.6%와 30.6%였다. 이 결과에서 YBE-12 균주 성장과 염료제거를 위한 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 최적농도는 0.05%였으나, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 농도 0.02%일 때의 염료제거 효율과 크게 차이가 나지 않았으므로 경제성등을 고려하여 배지 조성 중 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O의 주입농도를 0.02%(w/v)로 결정하였다.

이 실험에서 특이한 현상이 발생하였는데  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 의 농도가 0.05%(w/v) 보다 많은 주입량을 배지에 혼합시 미세한 결정의 침전물이 형성되었으며, 배양시간과  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  농도를 더욱 증가시키면 침전물의 부피와 양도 더욱 증가하였다. 이 같은 현상은 동일한 실험을 몇 차례 반복하였을 때도 계속 발생하였고, 균주 성장과 염료제거효율을 측정한 결과도 몇 차례 반복한 실험에서 일관성이 없었기 때문에  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  농도 0.07%(w/v)와 0.10%(w/v)에서 측정한 균주 성장과 염료제거효율은 Fig. 7에 넣지 않았다. 이는  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 을 0.05% (w/v) 보다 많이 주입하였을 때 배지중에서 다른 성분과 반응하여 침전물이 형성되었으며, 그것으로 인해 균주 성장과 염료제거효율이 일관성이 없이 떨어진 것으로 사료된다.

이상의 결과에서, 알칼리성 염료용액의 색도 제거를 위한 호알칼리성 염료제거균주 YBE-12을 배양하기 위한 배지조성은 증류수 1L에 대하여 yeast extract 0.25%(w/v), polypepton 0.25%(w/v),  $KH_2PO_4$  0.1%(w/v),  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.02%(w/v),  $Na_2CO_3$  1.0%(w/v)으로 하고, 배양온도는 35°C, 배양 초기 pH는 pH10으로 결정하였다. 여기서  $Na_2CO_3$ 를 비교적 많이 첨가한 것은 pH를 조절하여 알칼리성 염료용액을 만들기 위해 첨가한 것으로, 이미 Fig 4.에서 본 바와 같이 초기 pH 10에서 세포 성장과 염료제거효율이 가장 우수하였는데, 이때 초기 pH 10을 맞추기 위해  $Na_2CO_3$ 가 1.0%(w/v)포함된 배양액을 최적 배지조성으로 하였다.

### 3.6 각종 염료들의 대한 회분식 색도제거

염료제거균주 YBE-12의 특성조사에는 분산 염료 Disperse Red 60만 넣고 사용하였으므로, 이번에는 특성조사에서 결정한 배지조성에 각종 염료들을 Erlenmeyer flask에 각각 100mg/L가 되게 넣고 YBE-12를 24시간 회분식으로 배양하면서 시간에 따른 각 염료들의 농도변화를 조사하여 그 결과를 Fig. 8과 Fig. 9에 나타내었다. Fig. 8은 Disperse Red 60(anthraquinone 계), Disperse Blue 87(anthraquinone 계), Disperse Yellow 64(quinoline 계)가 각각 함유된 배지에서 YBE-12를 24시간 회분식으로 배양하였을 때 시간의 경과에 따른 각 분산염료들의 염료제거

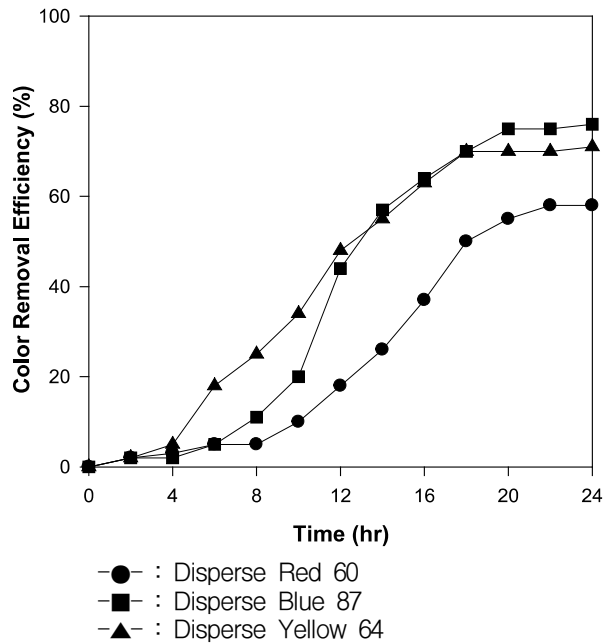


Fig. 8. Time course behavior of color removal efficiency at various disperse dyes in Erlenmeyer flask.

효율을 나타낸 것이다. Fig. 8에서 보면 24시간 배양 후 가장 많이 제거된 염료는 Disperse Blue 87이며 이 염료는 배양 6시간 후 본격적으로 제거되기 시작했고 배양 20시간 후 염료제거효율이 75%로 제거가 거의 완료된 것으로 볼 수 있으며, 24시간 배양 후 염료제거효율은 76%였다. Disperse Yellow 64는 배양 4시간 후 급격히 제거가 시작되었으며 배양 18시간 후 염료제거효율이 70%로 제거가 거의 정지된 것으로 볼 수 있으며, 24시간 배양 후 염료제거효율은 71%였다. Disperse Red 60은 배양 8시간 후 염료가 본격적으로 제거되기 시작하여 배양 22시간 후 염료제거효율은 58%로 제거가 거의 정지된 것으로 볼 수 있으며, 24시간 배양 후에도 염료제거효율 58%였다. 각각의 염료는 본격적인 제거가 시작되는 시간이 각각 달랐는데 Disperse Yellow 64가 가장 먼저 제거되기 시작했고 다음은 Disperse Blue 87과 Disperse Red 60의 순서였다. 따라서 먼저 염료제거가 시작된 염료에서 염료제거가 먼저 종료되었다. 이는 염료제거균주 YBE-12가 quinoline계 염료인 Disperse Yellow 64에서 쉽게 적응하여 염료제거가 빨리 시작한 반면, Disperse Red 60과 Disperse Blue 87은 anthraquinone계 염료이므로 적응하기가 힘들었기 때문에 염료제거가 늦게 시작된 것으로 사료된다.



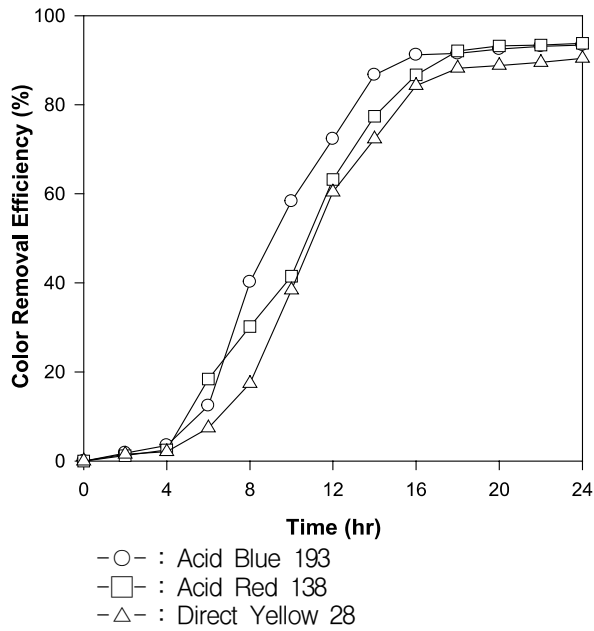


Fig. 9. Time course behavior of color removal efficiency at various acid & direct dyes in Erlenmeyer flask.

한편, 배양 24시간째 염료제거효율을 보면 먼저 염료제거가 시작된 Disperse Yellow 64가 Disperse Blue 87보다 염료제거효율이 낮았으며, 가장 늦게 염료제거가 시작된 Disperse Red 60은 가장 적게 염료가 제거되어 염료제거 시작시간과 염료제거효율은 크게 상관없는 것으로 판단된다.

Fig. 9는 수용성 염료인 Acid Blue 193(monoazo 계), Acid Red 138(azo 계), Direct Yellow 28(azo 계)이 각각 함유된 배지에서 YBE-12를 24시간 회분식으로 배양하였을 때 시간에 따른 각 수용성 염료들의 염료제거효율을 나타낸 것이다. Fig. 9에서 배양 24시간 후 각 염료별 제거효율을 보면, Acid Blue 193은 93%, Acid Red 138은 94%, Direct Yellow 28은 90%였다. 이들 세 염료는 배양 4시간 후부터 본격적인 제거가 시작되었고, Acid Blue 193은 배양 16시간까지 급격한 염료제거를 보였으며, 이 후 염료제거속도가 감소되었다. Acid Red 138과 Direct Yellow 28은 배양 18시간까지 활발한 염료제거가 이루어졌다.

#### 4. 결 론

염색폐수의 색도제거를 위해 염료제거기능이 우수한 호알칼리성 균주를 분리하였다. 선발한

균주는 동정결과 *Pseudomonas* sp.였으며 이 균주를 *Pseudomonas* sp. YBE-12로 명명하였다. YBE-12의 특성조사 결과 균주성장과 염료제거를 위한 최적 배양온도는 35°C, 최적 초기 pH는 10.0이었으며, 30~40°C의 온도범위에서 Disperse Red 60 제거효율은 33.5~36.9%였고 초기 pH8~pH10의 범위에서 Disperse Red 60 제거효율이 31.1~36.7%로 넓은 온도범위와 비교적 넓은 알칼리성 영역의 pH 범위에서 우수한 염료제거효율을 보였다. 다량영양소(macronutrients)에 따른 호알칼리성 미생물 YBE-12의 균주성장 및 염료제거를 위한 특성조사로부터, 배지의 조성은 증류수 1L에 대해 yeast extract 0.25%(w/v), polypeptone 0.25%(w/v), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1%(w/v), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.02%(w/v), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1.0%(w/v)로 결정하였다. 선발한 미생물을 계대배양하면서 활성화시킨 다음 이 미생물을 이용하여 분산염료와 수용성염료를 회분식으로 염료제거실험을 한 결과, 24시간 배양 후 Disperse Blue 87은 76%, Disperse Yellow 64는 71%, Disperse Red 60은 58%, Acid Blue 193은 93%, Acid Red 138은 94% Direct Yellow 23은 90% 각각 제거되었다.

#### 참고문헌

1. J. K. Glenn and M. H. Gold, Decolorization of Several Polymeric Dyes by the Lignin - Degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**(6), 1741-1747(1983).
2. M. W. Platt, Y. Hadar and I. Chet, The Decolorization of the Polymeric Dye Poly-Blue(polyvinylamine sulfonate-anthraquinone) by lignin degrading fungi, *Appl. Microbiol. Biotech.*, **21**, 394-396(1985).
3. S. Ohmomo, I. Aoshima, Y. Tozawa, N. Sakurada and K. Ueda, Purification and Some Properties of Melanoidin Decolorizing Enzymes, P-III and P-IV, from Mycelia of *Coriolus versicolor* Ps4a, *Agric. Biol. Chem.*, **49**(7), 2047-2053 (1985).
4. C. Yatome, T. Ogawa, D. Koga, and E. Idaka, Biodegradability of Azo and Triphenylmethane dyas by *Pseudomonas pseudomallei* 13NA, *J.*

- Soc. Dyers Colour*, **97**, 166-169(1981).
5. T. Ogawa, C. Yatome, E. Idaka and H. Kamiya, Biodegradability of Azo Acid Dyes by Continuous Cultivation of *Pseudomonas pseudomallei* 13NA, *J. Soc. Dyers Colour*, **102**, 12-14(1986).
  6. J. Liu and H. Liu, Degrading of Azo Dyes by Algae, *Environ. Pollu.*, **75**, 273-278(1982).
  7. A. S. Ball, W. B. Betts and A. J. Mccarty, Degradation of Lignin-Related Compounds by Actinomycetes, *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**(6), 1642-1644(1989).
  8. W. Zhou and W. Zimmermann, Decolorization of Industrial Effluents Containing Reactive Dyes by Actinomycetes, *FEMS Microbiology Letters*, **107**, 157-162(1993).
  9. A. Reife and H. S. Freeman, "Environmental Chemistry of Dyes and Pigments", John Wiley & Sons INC., New York, pp.3-31, 1996.
  10. C. G. Namboodri, W. S. Perkins and W. K. Walsh, Decolorizing Dyes with Chlorine and Ozone : Part I, *American Dyestuff Reporter*, **March**, 17-22(1994).
  11. C. G. Namboodri, W. S. Perkins and W. K. Walsh, Decolorizing Dyes with Chlorine and Ozone : Part II, *American Dyestuff Reporter*, **April**, 17-26(1994).
  12. T. Kudo and K. Horikoshi, Effect of pH and Sodium Ion on Germination of Alkalophilic *Bacillus* species, *Agric. Biol. Chem.*, **47**(4), 665-669(1983).
  13. K. Horikoshi, "Microorganisms in Alkaline Environments", Kodansha, Tokyo, pp.6-31, 1991.