

백색부후균에 의한 염료의 탈색

김현영 · 임영은 · 최형태 · 송홍규*

강원대학교 미생물학과
서울대학교 분자미생물학 연구센터

Decolorization of Dyes by White Rot Fungi

Hyoun-Young Kim, Young-Eun Leem, Hyoung-Tae Choi and Hong-Gyu Song

*Department of Microbiology, Kangwon National University, and Research Center for
Molecular Microbiology, Seoul National University.

ABSTRACT: Decolorization of poly R-478, congo red and methylene blue by 5 white rot fungi which were isolated in Korea has been carried out. *Coriolus versicolor* KR-11W and *C. versicolor* KR-65W gave the best results when they were grown under stationary culture. *C. versicolor* KR-11W decolorizes 100% of poly R-478 in 13 days, 100% of congo red in 7 days and 90% of methylene blue in 7 days. *C. versicolor* KR-65W decolorizes 100% of poly R-478 in 15 days, 85% of congo red in 7 days and 100% of methylene blue in 7 days. *Phanerochaete chrysosporium* IFO 31249, which was used as a control, decolorizes 35% of poly R-478 in 15 days, 85% of congo red in 7 days and 95% of methylene blue in 7 days.

KEYWORDS: Decolorization, poly R-478, congo red, methylene blue, white rot fungi

염료(dye)는 섬유와 염료산업의 폐수에 함유되어 자연환경에 방출되며 의학, 수의학 등에서도 염색 약으로 많이 이용된 후 방출된다. 이런 염료는 세척과 광조사(irradiation)에 저항성을 가져야만 하므로 통상적인 폐수처리 방법에 의해서는 수중에서 제거되지 않으며 자연환경에서 유기물 분해에 큰 역할을 하는 호기성 중속 영양체균들의 oxidative biodegradation에 의해서도 잘 분해되지 않는다 (Paszczynski *et al.*, 1992; Spadaro *et al.*, 1992). 많은 염료들은 그다지 큰 독성을 나타내지 않으나 미관상 악영향을 미치며 또한 태양광을 차단하여 조류에 의한 산소 발생을 저해함으로써 용존산소(DO)가 증가하지 못하고 호기성 중속 영양체균들의 호기성 분해가 제대로 일어나지 못하게 된다. 한편 일부 염료들 중에는 상당한 독성을 나타내는 것들이 있는데 그 중 triphenylmethane

dyes는 발암성이고 crystal violet은 potent clastogen으로 작용하며 또한 일부 어류에서 종양 생성을 촉진하는 것으로 추정되는 등, 폐수에서 각종 염료의 제거가 중요한 문제가 되고 있다.

목재를 부식시키는 균류의 한 종류인 백색부후균류는 목재의 주성분인 섬유소와 lignin을 분해·이용하는 능력을 가졌으며 이들은 lignin을 분해하는 데에 관련된 peroxidase균을 가지고 있다 (Orth *et al.*, 1993). Lignin은 phenylpropane의 random polymer 구조로 이루어졌으며 백색부후균은 이를 분해하는 효소균을 분비하여 aromatic ring의 구조를 분해시킨다. 이미 1980년대에 *Phanerochaete chrysosporium*을 이용하여 lignin model compound(Kirk *et al.*, 1983) 및 phenolic compound(Leatham *et al.*, 1983)의 분해에 대한 보고가 있었으며 최근에는 각종 염료 및 난분해성 물질의 분해에 대한 보고가 있었다 (Field *et al.*, 1993; Ollikka *et al.*, 1993). 본 연

*Corresponding author

구에서는 우리나라에 널리 분포되어 있는 백색부후균류를 대상으로 염료 탈색과 분해를 조사하여 탈색능이 높은 균주를 찾아내며 염료 탈색의 조건들을 분석하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양

본 실험에 사용된 *Microporus vernicipes* KL 71904, *Phanerochaete chrysosporium* IFO 31249, *Pleurotus ostreatus* ASI 2201은 서울대학교 분자미생물학 연구센터로부터, *Coriolus versicolor* KR-11W, *C. versicolor* KR-65W, *Irpex lacteus* KR-39W는 강릉대학교 김규중 교수로부터 분양받았다. 이들은 모두 YMG 완전배지 (yeast extract 4 g, malt extract 10 g, glucose 4 g, DW 1 L)의 한천사면배지에 배양(25°C)하고 냉장고에 보관하였다. YMG 한천평판배지에 배양된 각 균주의 균사를 Cork borer(#1)로 7개씩 떼어내어 YMG 액체배지(100 ml)에 접종하고 12~14일간 진탕배양(130 rpm) 하여 이를 접종원(seed culture)으로 사용하였다.

염료의 탈색 및 분석

본 실험에 사용한 염료는 azo dye, heterocyclic dye, 그리고 polymeric dye 중에서 각각 대표되는 1개씩을 선발하였다. Azo dye로는 congo red [3, 3'-([1,1'-biphenyl]-4-4'-diylbis (azo)) bis[4-amino]-1-naphthalenesulfonic acid(disodium

salt) (Sigma chemical Co.)], heterocyclic dye는 methylene blue [3,7-bis(dimethylamino)-phenothiazin-5-ium chloride (Sigma chemical Co.)], polymeric dye는 poly R-478 [CAS registry no.68550-77-6 (Sigma chemical Co.)]의 3가지를 증류수에 녹이고 여과멸균하여 사용하였다.

YMG 액체배지에서 진탕배양된 여러 가지 백색부후균들을 10 ml의 YMG 배지(△-flask 100 ml)에 접종하고(10% v/v) congo red(최종농도 5 µM), methylene blue(최종농도 5 µM), poly-R 478(최종농도 0.002%) 중 1가지의 염료를 각각 더한 후 진탕배양 및 정지배양을 시행하였으며 염료 탈색에 대한 산소의 효과를 분석하기 위하여 배양 3일째에 여과된 산소를 배양액으로 30초동안 포화시켰다. 탈색정도를 분석하기 위하여 일정 시간 간격마다 실험 flask 1개씩을 꺼내어 상등액의 흡광도를 분광광도계를 사용하여 congo red는 490 nm, methylene blue는 660 nm, poly R-478은 520 nm에서 각각 측정하였다. 또한 균사체가 흡착한 염료를 측정하기 위하여 균사체를 모아서 0.1 N NaOH 10 ml에 현탁시키고 1분간 vortex한 후 원심분리(13,000 rpm, 5분)하여 균사추출액의 흡광도를 측정하였다. YMG 완전배지에 대한 비교로서 포도당 최소배지(정 등, 1992)를 사용하여 염료의 탈색정도를 비교하였다. 균류의 생장을 측정하기 위하여 균사를 여과하고 증류수로 2회 세척한 다음 80°C에서 24시간 건조하여 중량을 측정하였다.

Table 1. Decolorization of poly R 478 by white rot fungi in YMG media on day 7(%^a)

Fungal strains Culture method	Cv11	Cv65	Il39	Mv04	PI2201	PcIFO
Static culture	37.3	38.4	54.5	72.2	64.4	74.3
Static culture+O ₂ flushing ^b	77.6	40.2	47.3	77.9	69.7	80.7
Shaking culture	74.2	51.5	63.3	78.2	67.5	78.1
Shaking culture+O ₂ flushing ^b	73.9	54.0	68.1	79.0	74.7	71.4

Cv11: *Coriolus versicolor* KR-11W, Cv 65: *Coriolus versicolor* KR-65W, Il 39: *Irpex lacteus* KR-39W, Mv 04: *Microporus vernicipes* KL 71904, PI 2201: *Pleurotus ostreatus* ASI 2201, Pc IFO: *Phanerochaete chrysosporium* IFO 31249

a) The numbers represent residual percentage of the dye, and mean value of triplicates.

b) O₂ flushing was done by bubbling of filter-sterilized O₂ into culture media for 30 seconds on the third day.

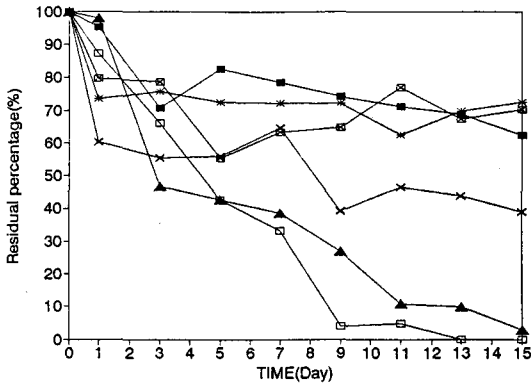


Fig. 1. Decolorization of poly R-478 by white rot fungi.

- : *Coriolus versicolor* KR-11W
- ▲: *Coriolus versicolor* KR-65W
- ×: *Irpex lacteus* KR-39W
- ×: *Microporus vernicipes* KL71904
- *: *Pleurotus ostreatus* ASI 2201
- : *Phanerochaete chrysosporium* IFO 31249

결과 및 고찰

Polymeric dye의 대표인 poly-R 478을 대상으로 백색부후균류에 의한 탈색을 1차로 분석한 결과는 Table 1과 같다. 배양 7일째의 결과만을 제시하였는데 전체적으로 진탕배양 보다는 정치배양에서 탈색의 효과가 좋았고 배양 3일째 산소를 더한 경우에 별다른 효과가 없었다. 이는 백색부후균류들이 진탕배양시 보다는 정치배양시 더 많은 peroxidase와 laccase를 분비하는 것과 일치하며(최, unpublished) *P. chrysosporium* IFO 31249의 경우에도 진탕배양시 lignin 분해효소의 역가가 낮다는 보고와 일치한다(Venkatadri & Irvine, 1990). Poly R-478을 대상으로 정치배양한 각 균류들의 탈색 결과 *C. versicolor* KR-11W는 배양 13일만에, *C. versicolor* KR-65W는 배양 15일만에 100% 탈색시킨 것에 비하여 외국에서 활발한 연구를 수행하는 *P. chrysosporium* IFO 31249는 35% 정도의 탈색을 보였다(Fig. 1). 이러한 결과는 최근 *P. chrysosporium* 외에도 다른 목재부후균류에 의한 lignin 분해에 대하여 보고되는 것(윤, 1994; Dey et al., 1994; Leontievsky et al., 1994)을 감안하면 매우 중요한 연구라고 하겠다.

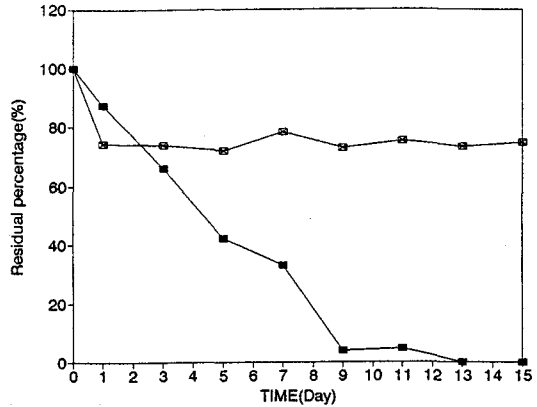


Fig. 2. Decolorization of poly R-478 by *Coriolus versicolor* KR-11W.

- : Stationary culture
- ×: Shaking culture

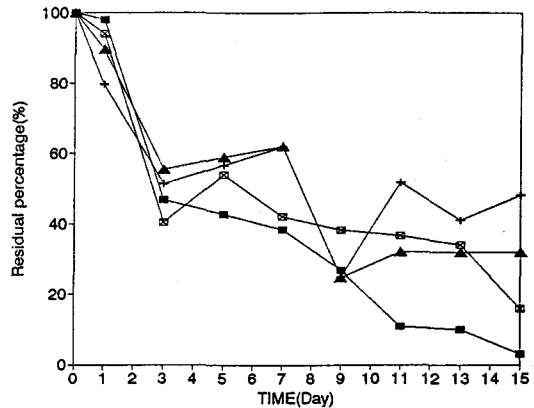


Fig. 3. Decolorization of poly R-478 by *Coriolus versicolor* KR-65W.

- : Stationary culture
- ▲: Stationary culture+O₂ flushing
- + : Shaking culture
- ×: Shaking culture+O₂ flushing

Poly R-478의 탈색에 가장 좋은 효과를 보였던 *C. versicolor* KR-11W와 *C. versicolor* KR-65W를 대상으로 정치배양과 진탕배양의 차이 및 산소포화의 차이를 비교하였다. Fig. 2에 나타난 것과 같이 *C. versicolor* KR-11W는 진탕배양의 경우 배양 15일에 30%의 탈색을 보인 반면 정치배양에서는 염료의 완전탈색이 확인되었다. *C. versicolor* KR-65W도 정치배양시 가장 좋은 탈색효과(11일에 잔존물 5% 이하)를 보였고 이때 산소포화의 효과도

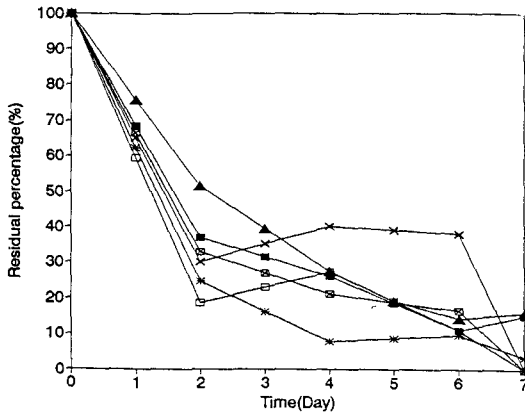


Fig. 4. Decolorization of congo red by white rot fungi.

- : *Coriolus versicolor* KR-11W
- ▲: *Coriolus versicolor* KR-65W
- ×: *Irpex lacteus* KR-39W
- ×: *Microporus vernicipes* KL71904
- *: *Pleurotus ostreatus* ASI 2201
- : *Phanerochaete chrysosporium* IFO 31249

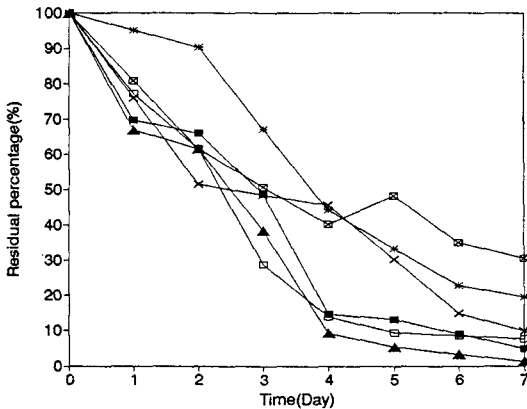


Fig. 5. Decolorization of methylene blue by white rot fungi.

- : *Coriolus versicolor* KR-11W
- ▲: *Coriolus versicolor* KR-65W
- ×: *Irpex lacteus* KR-39W
- ×: *Microporus vernicipes* KL71904
- *: *Pleurotus ostreatus* ASI 2201
- : *Phanerochaete chrysosporium* IFO 31249

없었다(Fig. 3).

정치배양한 백색부후균류의 congo red의 탈색에 대한 결과에서는 6가지의 균류들이 배양 7일만에 잔존물 20% 미만으로 염료를 제거하여 균류들간의 차이가 상대적으로 적었다(Fig. 4). *C. versicolor*

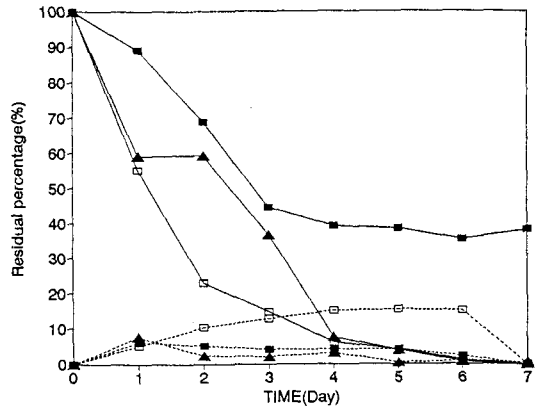


Fig. 6. Decolorization of dyes by *Coriolus versicolor* KR-65W.

- : Decolorization of poly R-478 in culture supernatant
- ▲—▲: Decolorization of methylene blue in culture supernatant
- : Decolorization of congo red in culture supernatant
- ...■: Relative concentration of poly R-478 absorbed in mycelium
- ▲...▲: Relative concentration of methylene blue absorbed in mycelium
- ...□: Relative concentration of congo red absorbed in mycelium

KR-11W, *I. lacteus* KR-39W가 가장 우수한 결과를 보였고 *P. ostreatus* ASI 2201, *M. vernicipes* KL 71904도 탈색률 95% 이상을 보였다. Methylene blue에 대한 탈색은 *C. versicolor* KR-65W가 배양 7일만에 100% 탈색률을 보였고 *P. chrysosporium* IFO 31249와 *C. versicolor* KR-11W도 탈색률 90% 이상을 보였다(Fig. 5).

이상과 같은 염료탈색의 효과가 균사의 흡착에 의한 것인가를 분석하기 위하여 *C. versicolor* KR-65W를 각각의 3가지 염료와 혼합배양하면서 상등액 및 균사체에 있는 염료의 농도를 분석하였다. Congo red가 상등액에서 진행되는 탈색의 정도가 제일 빠른 반면(Fig. 6) 균사에 흡착되는 정도도 제일 높았다(Fig. 6). 그러나 이들 3가지 염료들 모두 흡착에 의한 단순한 염료의 제거가 아니고 상등액 및 균사체에 의한 실제적인 탈색이 이루어졌음을 Fig. 6에서 확인할 수 있었다. 이는 *P. chrysosporium*에서 균사체와 상등액의 효소들이 공동으로

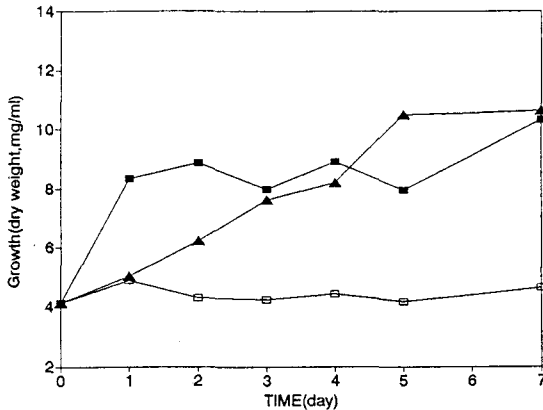


Fig. 7. Growth of white rot fungi in YMG liquid medium (stationary cultivation).

- : *Coriolus versicolor* KR-11W
- ▲: *Coriolus versicolor* KR-65W
- : *Phanerochaete chrysosporium* IFO 31249

trichlorophenol을 분해하였다는 보고(Armenante *et al.*, 1994)와 일치한다.

염료의 탈색에서 우수한 효과를 보인 *C. versicolor* KR-11W와 *C. versicolor* KR-65W 및 대조구로 사용한 *P. chrysosporium* IFO 31249의 성장정도를 정치배양한 YMG 액체배지에서 측정하였다. *P. chrysosporium* IFO 31249는 배양 2일까지 빠른 성장을 보였고 *C. versicolor* KR-65W는 일정한 속도의 성장을 보인 반면 *C. versicolor* KR-11W는 앞의 두가지 균류에 비하여 매우 저조한 성장증가(약 1/6)를 보였다(Fig. 7). 실제로 염색 폐수를 처리하기 위하여 백색부후균류를 이용할 때 균류의 생장이 2차적인 문제를 일으킬 수 있기 때문에 *C. versicolor* KR-11W는 염색폐수 처리에 상당한 가능성이 있다고 하겠다.

백색부후균류에 의한 염료폐수의 탈색이 YMG 액체배지와 같은 완전배지에서만 가능하다면 백색부후균류에 의한 염료폐수의 탈색은 불가능하게 된다. 따라서 완전배지가 아닌 최소배지의 조건에서도 선별된 3가지 균류를 대상으로 methylene blue에 대한 탈색정도를 분석하였다. *C. versicolor* KR-11W의 경우 YMG 완전배지와 비교할 때 거의 비슷한 정도(약 95%의 탈색률)를 보였으나 *C. versicolor* KR-65W와 *P. chrysosporium* IFO 31249의 경우 완전배지(90~100% 탈색률)와 비교

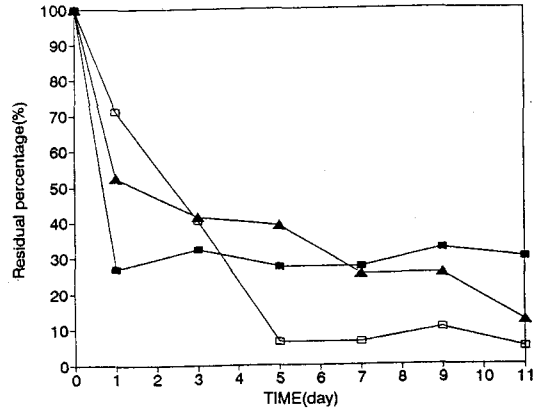


Fig. 8. Decolorization of methylene blue by white rot fungi in minimal medium.

- : *Coriolus versicolor* KR-11W
- ▲: *Coriolus versicolor* KR-65W
- : *Phanerochaete chrysosporium* IFO 31249

할 때 75% 정도의 탈색률을 보이는 것으로 나타났다(Fig. 8). 한편 *C. versicolor* KR-11W, *C. versicolor* KR-65W, *P. ostreatus* ASI 2201 및 *P. chrysosporium* IFO 31249의 배양상등액을 Ammonium sulfate로 침전시켜 조효소를 얻은 다음 이를 각 염료를 대상으로 pH 4~6에서의 탈색정도를 실험하였으나 10% 정도의 탈색률을 보였으며(결과 미제시) 이는 배양균에 의한 염료의 탈색률과 비교할 때 매우 저조한 결과이며 효소만을 사용한 Ollikka 등(1993)의 결과와 비교할 때에도 낮은 수치이다. 이는 veratryl alcohol(Tonon & Odier, 1988) 및 lignosulfonate(김 등, 1988) 등 lignin 분해효소의 유도체에 의하여 생성된 효소를 이용하여 염료의 탈색을 실험할 필요가 있다고 본다.

적 요

백색부후균류에 의한 poly R-478, congo red 및 methylene blue 등 3가지 염료의 탈색을 여러가지 배양조건에서 분석한 결과 국내에서 분리한 구름버섯 (*Coriolous versicolor* KR-11W와 *C. versicolor* KR-65W) 2균주가 정치배양시 가장 우수한 효과를 나타내었다. *C. versicolor* KR-11W는 poly R-478을 13일만에, congo red를 7일만에 100%, methylene blue를 7일만에 90%까지 탈색

시켰다. *C. versicolor* KR-65W는 poly R-478을 15일만에 100%, congo red를 7일만에 85%, methylene blue를 7일만에 100%까지 탈색시켰다. 대조구로 사용한 *Phanerochaete chrysosporium* IFO 31249는 poly R-478을 15일만에 약 35%, congo red를 7일만에 85%, methylene blue를 7일만에 95%까지 탈색시켰다.

사 사

이 실험에 사용된 3개의 균주를 분양한 김규중 박사에게 감사를 드린다. 이 연구는 학술진흥재단(94 지방대 육성, 송홍규) 및 서울대 분자미생물학 연구센터(최형태)의 연구비로 수행되었으며 이에 감사를 드린다.

參考文獻

- 김규중, 신광수, 맹진수, 성치남. 1988. 탄수화물과 황산암모늄이 *Pseudomonas diminuta*의 리그닌 분해에 미치는 영향. 미생물학회지 **26**: 129-136.
- 윤경하. 1994. 구름버섯(*Coriolus versicolor* IFO 30388)에 의한 Poly R-478 염료의 탈색. 미생물학회지 **32**: 182-185.
- 정해숙, 최형태, 윤권상. 1992. *Trimorphomyces papilionaceus*에서 laccase의 catabolite repression에 의한 조절. 미생물학회지 **30**: 78-82.
- Armenante, P.M., Pal, L., and G. Lewandowski. 1994. Role of mycelium and extracellular protein in the biodegradation of 2,4,6-trichlorophenol by *Phanerochaete chrysosporium*. *App. Environ. Microbiol.* **60**: 1711-1718.
- Dey, S., Maiti, T.K. and Bhattacharyya, B.C. 1994. Production of some extracellular enzymes by a lignin peroxidase-producing brown rot fungus, *Polyporus ostreiformis*, and its comparative abilities for lignin degradation and dye decolorization. *App. Environ. Microbiol.* **60**: 4216-4218.
- Field, J., Jong, E., Feijoo-Costa, G. and Bont, J.A.M. 1993. Screening for ligninolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotics. *Trends in Biotech.* **11**: 44-49.
- Kirk, T.K., Nakatsubo, F. and Reid, I.D. 1983. Further study discounts role for singlet oxygen in fungal degradation of lignin model compounds. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **111**: 200-204.
- Leatham, G.F., Crawford, R.L. and Kirk, T.K. 1983. Degradation of phenolic compounds and ring cleavage of catechol by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**: 191-197.
- Leontievsky, A.A., Myasoedova, N.M. and Golovleva, L.A. 1994. Production of lignolytic enzymes of the white rot fungus *Panus tigrinus*. *J. Biotech.* **32**: 299-307.
- Ollikka, P., Alhonmaki, K., Leppanen, V., Glumoff, T., Rajjola, T. and Suominen, I. 1993. Decolorization of azo, triphenyl methane, heterocyclic, and polymeric dyes by lignin peroxidase isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 4010-4016.
- Orth, A., Royse, D. and Tien, M. 1993. Ubiquity of lignin-degrading peroxidases among various wood-degrading fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 4017-4023.
- Paszczynski, A., Pasti-Grigsby, M.B., Goszczynski, S., Crawford, R.L. and Crawford, D.L. 1992. Mineralization of sulfonated azo dyes and sulfanilic acid by *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomyces chromofuscus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3598-3604.
- Spadaro, J., Gold, M.H. and Renganathan, V. 1992. Degradation of azo dyes by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 2397-2401.
- Tonon, F. and Odier, E. 1988. Influence of veratryl alcohol and hydrogen peroxide on ligninase activity and ligninase production by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 466-472.

Venkatadri, R. and Irvine, R.L. 1990. Effect of agitation on ligninase activity and ligninase production by *Phanerochaete*

chryso sporium. *Appl. Environ. Micorbiol.* **56**: 2684-2691.