

큰느타리 (*Pleurotus eryngii*)의 수확 후 배지추출물을 이용한 다양한 염료의 탈색효과

임선화^{1,2} · 곽아민¹ · 민경진¹ · 김상수¹ · 이상엽³ · 강희완^{1,2*}

¹한경대학교 미래융합기술대학원, ²한경대학교 유전공학연구소, ³국립농업과학원 농업미생물과

Decolorization Efficiency of Different Dyes by Extract from Spent Mushroom Substrates of *Pleurotus eryngii*

Seon Hwa Lim^{1,2}, A Min Kwak¹, Gyeong Jin Min¹, Sang Su Kim¹, Sang Yeop Lee³ and Hee Wan Kang^{1,2*}

¹Graduate School of Future Convergence Technology, Hankyong National University, Ansung 456-749, Korea

²Institute of Genetic Engineering, Hankyong National University, Ansung 456-749, Korea

³Agricultural Microbiology Division, National Academy of Agricultural Science, RDA, Wanju 565-851, Korea

ABSTRACT : Water extract from spent mushroom substrates (SMS) of *Pleurotus eryngii* was utilized in decolorization of eight synthetic dyes and wastewater from a textile factory. High laccase activity was detected in the extract of *P. eryngii* (SMSE). The SMSE showed that decolorization rate was 34~93% after 24 h incubation without any mediator on eight dyes including Rit-blue and Rit-red used in fiber dyeing. Dye decolorization rate more than 90% was observed on bromophenol blue and remazol brilliant blue R (RBBR). Dye in textile wastewater was decolorized at room temperature after three days by addition of *P. eryngii* SMSE. The results suggest that biological decolorization of dyes using the *P. eryngii* SMSE can be used as environmental friendly materials.

KEYWORDS : Dye decolorization, *Pleurotus eryngii*, Spent mushroom substrate, Water extract

서론

국내의 농산버섯 총 생산량은 2013년 173,354톤으로 느타리(*Pleurotus ostreatus*), 큰느타리(*P. eryngii*), 팽이버섯(*Flammulina velvipes*)이 87%를 차지하고 있으며 큰느타리는 느타리류 총 생산량의 절반 이상을 차지할 정도로 최근 생산량이 급격히 증가하였다[1]. 버섯인공재배 시에 사용되는 배지원재료는 면실박, 톱밥, 비트펄프, 콘코브이 이

용되고 있으며 cellulose, hemicellulose, lignin 등의 목질 섬유소를 포함하고 있다. 버섯은 cellulase, xylanase, laccase 등 목질섬유소 분해효소를 생산하여 목질섬유를 분해하고 분해산물인 당을 에너지원으로 이용한다[2]. 큰느타리의 인공재배는 봉지 또는 병 재배형태로 재배되고 있으며 자실체를 수확하고 남은 배지를 수확 후 배지(spent mushroom substrate, SMS)라고 한다. 일반적으로 버섯 1 kg 생산에 버섯배지가 5 kg이 소비되는 것으로 추정되며 큰느타리 생산량이 년 50,000톤으로 볼 때 250,000톤의 SMS가 생산되는 것으로 추정할 수 있다. SMS 내에는 원배지표면에 균사체가 밀집하게 성장한 형태를 볼 수 있으며 cellulase, xylanase, laccase 등의 효소들이 잔존하고 있는 것으로 보고되고 있다[3]. laccase는 세균이나 기타 진균류에서 유전자조작 등의 방법으로 대량생산 시도하였지만 발현 숙주의 성장저해와 적은 발현양 등 해결하여야 할 문제점이 많다[3]. 큰느타리 SMS에는 느타리, 팽이버섯 등 다른 버섯 종의 SMS에 비하여 10배 이상의 높은 laccase활성이 있는 것으로 보고된 바 있다[4].

Laccase는 섬유, 제지, 화장품 산업과 하수의 탈색과 독소를 제거를 통한 유해성분정화와 바이오센서에 이르기까지

Kor. J. Mycol. 2014 September, 42(3): 213-218
<http://dx.doi.org/10.4489/KJM.2014.42.3.213>
 pISSN 0253-651X • eISSN 2383-5249
 © The Korean Society of Mycology

*Corresponding author

E-mail: kanghw2@hknu.ac.kr

Received September 18, 2014

Revised September 22, 2014

Accepted September 23, 2014

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

산업적으로 광범위하게 적용될 수 있다[5-11]. 합성염료인 azo, anthraquinone, triphenylmethane과 phthalocyanine 계통의 염료는 섬유산업에서 사용량이 증가하고 있다. 최근에는 세계적으로 연간 700,000 톤 이상의 염료가 생산되고 있으며 섬유염색, 식품, 화장품, 종이염색 등 다양한 산업분야에 사용되고 있다[12]. 이러한 염료는 섬유산업에 특히 많이 이용되고 있는데, 염료의 종류에 따라 2~50%의 염료가 섬유와 결합하지 않고 주변의 토양이나 바다에 폐수로 손실된다[13, 14]. 대부분의 염료를 1 mg/L의 농도에서도 확인이 가능하며, 섬유산업의 폐수에 포함된 염료는 10~200 mg/L의 농도이고, 몇몇의 염료는 염료자체 또는 그 부산물이 발암 물질로 심각한 오염원이 될 수 있다[15]. 최근의 연구에서 섬유 폐수에 의해 오염된 토양과 물의 주변에서 돌연변이 발생이 증가하고 수생 생태계에서는 빛의 투과를 막으며 산소 전달을 어렵게 하여 생태계를 파괴하고 있어 섬유 폐수의 탈색에 관한 관심이 높아지고 있다[16]. 또한 이러한 합성염료는 난 분해성 물질로 심각한 환경오염을 야기하고 있어 염색제로 인한 오염원을 제거하려는 연구가 이루어지고 있다[16, 17]. 그 하나의 방법으로 물리 화학적 방법인 응고나 응집의 방법은 안전한 폐기를 위하여 고도의 기술과 시설의 비용도 많이 들고 추가적인 처리가 필요하여 이차적인 오염원을 만드는 악순환이 이어지고 있다. 위와 같은 환경오염을 해결하고자 곰팡이나 세균, 효모가 생산하는 laccase를 이용한 생물학적 탈색효과를 연구한 바 있다[7]. 큰느타리 SMS는 높은 laccase 활성을 보유하며 Remazol Brilliant Blue (RBBR)와 Congo red 등에 대한 높은 탈색효과가 보고되었으나[4], 큰느타리 SMS의 산업적 적용을 위해서는 다양한 염료와 산업 폐수염료 등에 대한 적응성과 최적 탈색효과 등의 보충연구가 필요하다.

본 연구에서는 큰느타리 SMS 추출액을 산업염료 탈색에 적용하기 위하여 직물염료를 포함한 8종류의 염료를 대상으로 탈색효과의 최적조건을 조사하였으며 더 나아가 공장 폐수염료 탈색을 시험하였던 바 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

큰느타리 SMS 추출액

큰느타리 SMS는 병 재배 버섯농가에서 분양 받았으며 Lim 등[2]의 방법에 의하여 추출액을 준비하였다. 물과 SMS를 3:1(v/w)의 비율로 혼합하여 2시간 동안 실온에서 200 rpm에서 진탕하였다. SMS혼합액을 미라크로스로 거르고 10,000 rpm에서 15분 동안 원심 분리하여 SMS 잔여물을 침전 제거하고 상등액을 SMS extract (SMSE)로 하여 탈색실험에 이용하였다.

Laccase 활성측정

위의 방법에 의하여 추출된 느타리와 큰느타리 SMSE를

60% ammonium sulfate로 농축하여 1/10배의 증류수에 현탁 후, 투석튜브(10,000 kDa Mole. cut)에 넣고 4°C에서 물에서 투석하여 시료를 준비하였다. Laccase 활성은 준비된 시료 10 µL에 sodium acetate buffer (pH 4.0)에 녹인 0.5 M 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS)를 기질로 첨가하여 실온에서 5분 동안 반응시키고 20%의 trichloroacetic acid (TCA)로 반응을 정지시킨 후, OD 420 nm 파장에서 ABTS의 산화를 OD값으로 측정하였다. 정제된 느타리 laccase (Sigma, 11 unit/mL)를 50배 희석하고 본 연구의 SMS의 laccase 활성을 비교하기 위하여 사용되었다.

큰느타리 SMS 추출액을 이용한 염료탈색

물로 추출한 큰느타리 SMS 추출액을 시중에서 판매하는 직물염색에 이용되는 Rit-blue (500 ppm), Rit-red (500 ppm)를 포함하여 Bromophenol blue (100 ppm), Congo red (500 ppm), Coomassie brilliant blue (100 ppm), Crystal violet (500 ppm), Methylene blue (100 ppm), Ramazol brilliant blue R (500 ppm) 등 인공색소까지 총 8종의 염료에 적용하였다. 탈색률은 각 염료의 최대 파장을 400~700 nm 영역을 스캔하여 조사하였다. 반응 조건은 10 µL의 SMS추출액을 90 µL의 각각의 염료와 섞어서 진행하였으며, 10~60°C의 다양한 온도 조건에서 온도별 탈색률은 24시간 반응하여 확인하였다. 또한 각 염료의 시간에 따른 반응을 확인하고자 0~24시간 동안의 탈색률을 조사하였다. 탈색백분율(%)은 $(A_0 - A/A_0) \times 100$ 으로 나타내었으며, A_0 =염료의 최대 흡수파장이며, A =반응샘플의 흡수파장을 나타낸다. 큰느타리 SMS 추출액의 염료폐수의 탈색효과를 검증하기 위하여 안산 섬유공장에서 수거한 염료 폐액 1 mL에 큰느타리 SMS 추출액을 각각 10, 20, 30, 40, 50 µL를 첨가하여 3일간 실온에서 반응하여 탈색여부를 확인하였다.

결과 및 고찰

큰느타리 SMS 추출액의 laccase 활성

SMS를 이용한 탈색연구는 *Lentinus polychrous* SMS에서 분리된 laccase에 의한 RBBR 탈색효과가 보고된 바 있으며[18] 느타리 SMS 추출물의 탈색이용도 보고된 바 있다[19]. 곰팡이가 생산하는 리그닌 분해효소의 탈색효과 연구에서 manganese peroxidase, arylalcohol oxidase 그리고 lignin peroxidase보다 laccase가 탈색에 직접적으로 관련되어 있다고 보고되었다[20]. 본 연구에서도 laccase가 탈색에 직접적인 관련이 있을 것으로 판단되어 시판하는 laccase 효소와 느타리, 큰느타리 SMS 물추출액을 이용하여 ABTS의 산화반응으로 laccase의 함량을 OD 값으로 비교하였다. 그 결과 큰느타리가 느타리 SMS보다 높은 laccase활성을 함유하고 있음을 확인하였고, 시판하는 laccase(1/50)보다는 1.4배 정도 높은 활성을 보였다(Fig. 1). 전 연구에서 국내

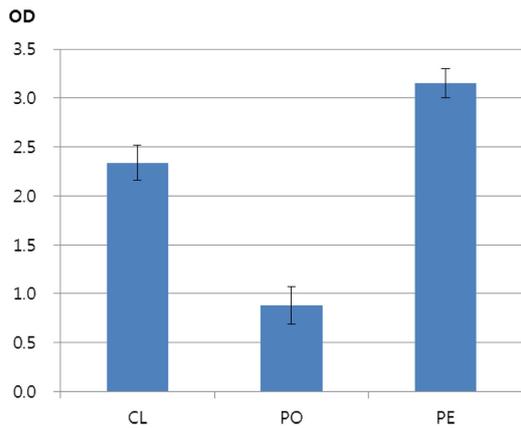


Fig. 1. Comparison of laccase activity of *Pleurotus eryngii* SMS extract to commercial laccase (CL) and *Pleurotus ostreatus* SMSE (PO). The OD values indicate laccase activities in different materials. The laccase activity value means three replicates CL: Commercial laccase 0.2 U/ml (Sigma), PO: *Pleurotus ostreatus* SMSE, PE: *Pleurotus eryngii* SMSE.

에서 식용으로 재배하고 있는 다양한 버섯 SMS추출물의 효소활성을 조사한 바 타 버섯 종의 SMS에 비하여 큰느타리버섯 SMS에서 많게는 10배 이상의 높은 laccase활성이 있는 것으로 보고된 바 있다[4].

큰느타리 SMS 추출액의 다양한 염료에 대한 탈색효과

본 연구는 큰느타리 SMS 추출액의 다양한 염료탈색효과를 조사하기 위하여 8가지 염료 Bromophenol blue (605 nm), Congo red (532 nm), Coomassie brilliant blue (627 nm), Crystal violet (589 nm), Methylen blue (587 nm), Ramazol brilliant blue R (597 nm)와 일반적으로 식물염료를 사용하는 Rit-blue (510 nm), Rit-red (603 nm)에서 염료에 따른 특징적인 파장에서 측정하였다. Fig. 2은 각 염료에 SMSE를 실온에서 처리 24시간 후 확인한 염료

탈색률을 측정하여 bromophenol blue는 가장 높은 93.7%의 탈색율을 얻은 노란색으로 탈색되었으며, 그 다음으로 88.7%의 탈색을 보인 푸른색 염료인 remazol brilliant blue R은 노란색으로 탈색되었다. 그밖에 72.13%로 비교적 높은 탈색률을 보인 진황색 Congo red는 옅은 황색으로 탈색되었으며 Crystal violet는 57.6%의 탈색율로 핑크색 탈색이 나타났다. 식물염색에 사용되는 Rit (red)와 Rit (blue)는 51.6%와 30.4%의 비교적 낮은 탈색율을 보였으며 Methylen blue 염료는 탈색률이 검출되지 않았다. 대조구로 사용된 100°C 고온 열처리된 큰느타리 SMS추출물은 모든 염료에서 탈색효과가 없었다. 이는 탈색에 작용하는 laccase 등의 효소가 열처리로 인하여 불활성화된 결과로 보여진다.

일반적으로 laccase는 분자상의 산소를 전자수용체로 이용하는 phenoloxidase로 작용하여 mono- 및 폴리페놀성 기질의 ortho- 및 para-hydroxyl group이나 방향족 아민을 직접적으로 산화하며 산화 환원 매개체로서 작용하는 인공 기질이나 대사산물이 존재할 경우 비페놀성 리그닌 단위 뿐만 아니라 몇몇 방향족 인공화합물과 지방족 인공화합물을 분해하는 것으로 보고되어 있다[7]. 따라서 본 연구에 이용된 염류는 각각의 특징적인 화학구조를 가지고 있어 큰느타리 SMS 추출액 내에 존재하는 laccase 등의 효소의 탈색기작이 염료에 따라 다르게 나타난 것으로 사료된다.

큰느타리 SMS의 8가지 염료에대한 탈색효과를 시간과 온도를 달리 하여 조사하였다. 10~60°C의 다양한 온도 조건에서 각각의 염료탈색효과를 확인한 결과 10~50°C의 온도에서 비교적 안정된 탈색효과를 보였다(Fig. 3).

시간에 따른 염료 탈색율은 bromophenol blue와 remazol brilliant blue R의 경우 SMSE처리 1시간 후에 반응이 나타나기 시작하여 반응 4시간에는 60%의 탈색효과를 보였고 12시간 후에는 80% 이상의 높은 탈색율을 보였다(Fig. 4). Congo red의 경우 2시간부터 상향의 염료탈색효과를 보이기 시작하여 24시간 후에는 60%까지 탈색되었다. 그러나 다른 염료는 위의 염료에 비하여 시간에 따른

Dyes	Dye decolorization	Wavelength	Decolorization rate
Rit (red)		510nm	51.61(%)
Rit (blue)		603nm	30.38(%)
Bromophenol blue		605nm	93.74(%)
Congo red		532nm	72.13(%)
Coomassie brilliant blue		627nm	33.11(%)
Crystal violet		589nm	57.67(%)
Methylen blue		587nm	Non detected
Remazol brilliant blue R		597nm	88.69(%)

Fig. 2. Decolorization of eight dyes by water extracts from spent mushroom substrate (SMS) of *Pleurotus eryngii*. The dye decolorization rate was measured after a day. First well lines : addition of 10 µL boiled SMS extract in dye solutions, 2th, 3th, and 4th well lines: addition of 10 µL SMS extract in 90 µL dye solutions.

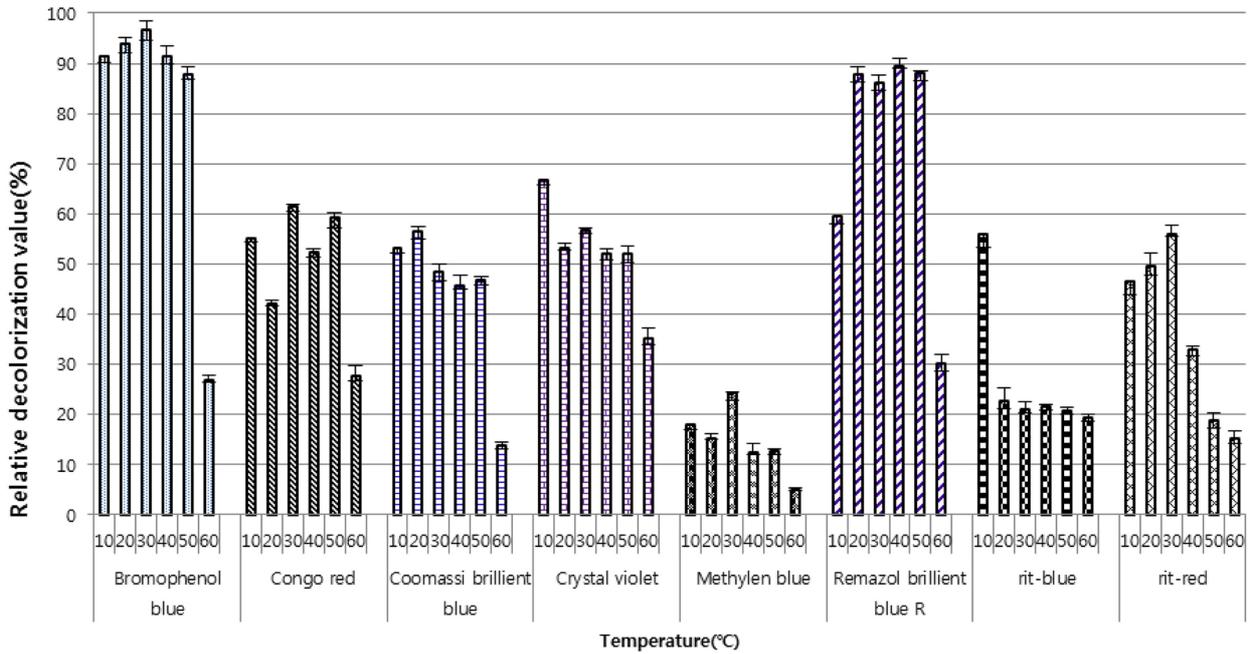


Fig. 3. Decolorization of eight dyes on different temperature using the *Pleurotus eryngii* SMS extracts.

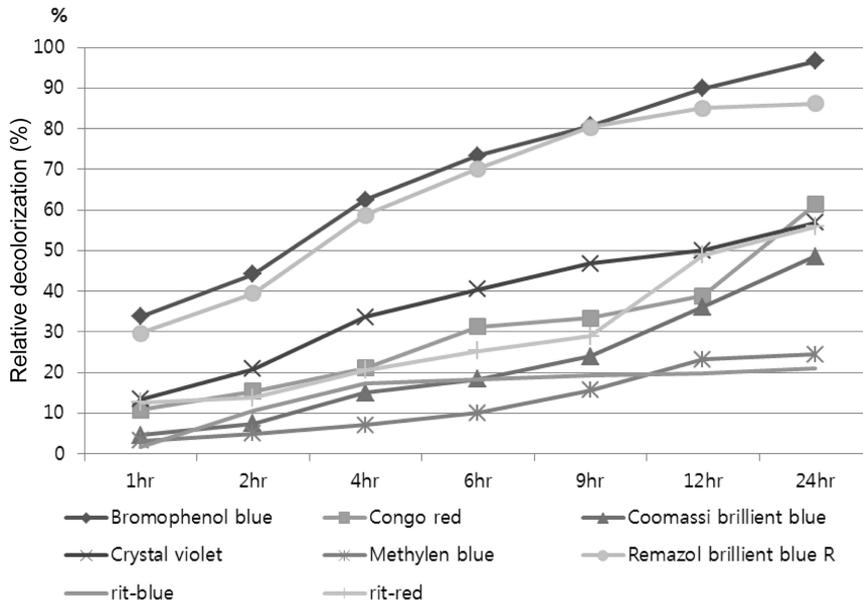


Fig. 4. Effect of dye decolorization rate of different dyes by extract from *Pleurotus eryngii* SMS on time intervals. Each 10 μ L aliquot of the SMC extract was applied to the dye decolorization. Each dye decolorization was measured by using a spectrophotometer on wavelengths ranged from 500 nm to 650 nm. The blank indicates the use of boiled SMC extract in reaction.

탈색이 서서히 진행되는 것으로 나타났다. Couto 등 [7]과 Kunamneni 등 [21]은 폐놀성분의 흡수 등 bioremediation과 산업 폐 염료탈색 등 환경정화에 laccase의 유용성을 제시한 바 있다. 또한 *Lentinus polychrous* SMS 내의 laccase가 remazol brilliant blue R탈색에 중요한 작용을 한다고 보고된 바 있다 [18]. 따라서 큰느타리 SMS추출액에는 높은

활성의 laccase가 다양한 염료탈색에 작용하는 것으로 사료되었다.

큰느타리 SMS 추출액의 폐 염료 탈색효과

큰느타리 SMS추출물의 섬유공장으로부터 수거한 산업폐수의 탈색효과를 조사하였다. 이를 위하여 안산에 위치한

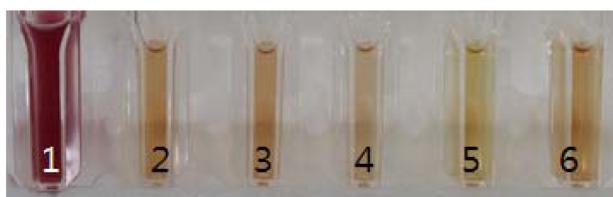


Fig. 5. Dye decolorization of textile mill wastewater using *Pleurotus eryngii* SMSE. 1. boiled SMSE of *Pleurotus eryngii*; 2. 10 μ L of *P. eryngii* SMSE; 3. 20 μ L of *P. eryngii* SMSE; 4. 30 μ L of *P. eryngii* SMSE; 5. 40 μ L of *P. eryngii* SMSE; 6. 50 μ L of *P. eryngii* SMSE.

섬유공장에서부터 산업용 폐 염료를 얻어 실험에 사용하였다. 사용한 섬유공장에서부터 정보를 제공 받지 못하여 폐수 내 염료성분은 알 수 없었으나 자주색의 염료를 함유하고 있었다(Fig. 5). 폐수 염료에 대한 큰느타리 SMSE의 탈색효과를 검정하기 위하여 SMSE를 10, 20, 30, 40, 50 μ L씩을 폐수 1 mL와 혼합하여 25°C에서 반응하였다. 반응 1일 후부터 탈색이 진행되어, 3일 후에는 짙은 자주색 염료가 옅은 노란색으로 탈색되었으나 고온 처리하여 laccase 활성이 없어진 대조구는 탈색효과가 없었다(Fig. 5). 본 실험에 사용된 산업 폐 염료에 부가적인 다양한 화학성분이 함유되어 있을 것으로 추정되며 이러한 물질이 탈색반응을 억제함으로써 탈색효과가 지연된 것으로 사료된다. 일반적으로 공장 폐 염료의 탈색은 고온, 고압과 산화처리 등 부가적인 처리시설이 필요하며 결과물이 일반 폐수로 흘러 버려지기 때문에 환경오염의 원인이 될 수 있다[13-15]. 따라서 환경친화적인 생물학적 염료 탈색법이 요구되고 있으며 향후 산업적 적용이 보완된다면 국내에서 대량 생산되는 농업 폐 자원인 큰느타리 SMS를 산업 폐 염료의 생물학적 탈색제로서 이용 가능할 것으로 기대된다.

적 요

높은 laccase 활성을 보유한 큰느타리 수확 후 배지추출물(SMSE)은 bromophenol blue과 remazol brilliant blue R 염료에서 각각 93.7%와 88.7%의 높은 탈색효과를 나타내었다. 그 외의 Congo red는 72.13%을 보인 반면에 다른 염료는 60% 내의 탈색효과를 나타내었다. 특히 직물염색에 사용되는 Rit (red)와 Rit (blue)는 51.6%와 30.4%의 비교적 낮은 탈색율을 보였으며 Methylene blue 염료는 탈색률이 검출되지 않았다. 염료는 20~30°C의 온도에서 가장 높은 탈색율을 보였고, 50°C까지 높은 염료 탈색효과를 보였다. 시간에 따른 염료 탈색효과 실험에서 bromophenol blue와 remazol brilliant blue R은 SMSE 처리 1시간 후에 반응이 나타나기 시작하여 12시간 후에는 80% 이상의 높은 탈색율을 보였으나 다른 염료들은 탈색 정도가 서서히 증가되어 24시간 후 최고 60%의 탈색율을 보였다. 큰느타

리 SMSE는 섬유공장에서부터 수집한 산업 폐 염료의 탈색효과를 나타내어 환경친화적인 염료탈색의 산업적 이용성을 제시하였다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호 PJ009969) 연구지원에 의해 수행된 결과이며, 곽아민, 민경진, 김상수에게 BK21 Plus 프로그램의 장학금이 지원됐습니다.

REFERENCES

1. Ministry of agriculture, food and rural affairs [cited 2013 sep] Available from: 2013; <http://library.mafra.go.kr/skyblue/image/17767.pdf>
2. Lim SH, Lee YH, Kang HW. Optimal extraction and characteristics of lignocellulytic enzymes from various spent mushroom composts. *Mycobiology* 2013;41:160-6.
3. Couto SR, Toca Herrera JL. Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. *Biotechnol Adv* 2006;24:500-13.
4. Lim SH, Kim JK, Lee YH, Kang HW. Production of lignocellulytic enzymes from spent mushroom compost of *Pleurotus eryngii*. *Mycobiology* 2012;40:152-8.
5. Lynd LR, Weimer PJ, van Zyl WH, Pretorius IS. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev* 2002;66:506-77.
6. Bolobova AV, Askadskii AA, Kondrashchenko VI, Rabinovich ML. Theoretical principles of technology of wood composites. Book II. Enzymes, Models, Processes, Nauka, Moscow. 2002.
7. Call HP, Mucke I. History overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems. *J Biotechnol* 1997;53:163-202.
8. Gianfreda L, Xu F, Bollag JM. Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremediat J* 1999;3:1-25.
9. Mayer AM, Staples RC. Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry* 2002;60:551-65.
10. Minussi R, Pastore GM, Duran N. Potential applications of laccase in the food industry. *Trends Food Sci Technol* 2002; 13:205-16.
11. Yarpolov AI, Skorobogat'ko OV, Vartanov SS, Varfolomeev SD. Laccase, Properties, catalytic mechanism, and applicability. *Appl Biochem Biotechnol* 1994;49:257-80.
12. Moosvi S, Kher X, Madamwar D. Isolation, characterization and decolorization of textile dyes by a mixed bacterial consortium JW-2. *Dyes Pigments* 2007;74:723-9.
13. Ganesh R, Boardman GD, Michelon D. Fate of azo dyes in sludges. *Water Res* 1994;28:1367-76.
14. O'Neill C, Hawkes FR, Hawkes DL, Lourenco ND, Pinheiro HM, Delee W. Color in textile effluents sources, measurement, discharge consents and simulation: a review. *J Chem Technol Biotechnol* 1999;74:1009-18.
15. Levine WG. Metabolism of azo dyes: implication for detoxication and activation. *Drug Metab Rev* 1999;23:253-309.
16. Rajaguru P, Vidya L, Baskarathupathi B, Kumar PA, Pala-

- nivel M, Kalaiselvi K, Genotoxicity evaluation of polluted ground water in human peripheral blood lymphocytes using the comet assay. *Mut Res* 2002;517:29-37.
17. Umbuzeiro GA, Freeman H, Warren SH, Oliveira DP, Terao Y, Watanabe T, Claxton LD. The contribution of azo dyes to the mutagenicactivity of the Cristais River. *Chemosphere* 2005;60:55-64.
 18. Saranyu K, Rakrudee S. Laccase from spent mushroom compost of *Lentinus polychrous* Lev. and its potential for remazol brilliant blue R decolourisation. *Biotechnology* 2007;6:408-13.
 19. Papinutti L, Forchiassin F. Adsorption and decolorization of dyes using solid residues from *Pleurotus ostreatus* mushroom production. *Biotechnol Biopro Engineer* 2010;15:1102-9.
 20. Lim SH, Lee YH, Kang HW. Efficient Recovery of lignocellulolytic enzymes of spent mushroom compost from oyster Mushrooms, *Pleurotus* spp., and Potential Use in Dye Decolorization. *Mycrobiology* 2013;41:214-20.
 21. Kunamneni A, Ballesteros A, Plou FJ, Alcade M. Fungal laccases-a versatile enzyme for biotechnological applications. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, A. Mendez-Vilas, 2007; 233-45.