(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0010606
(43) 공개일자 2014년01월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/14 (2006.01) *B09C 1/10* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0077052
(22) 출원일자 2012년07월16일
심사청구일자 2012년07월16일

(71) 출원인
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
대한민국(환경부 국립생물자원관장)
인천광역시 서구 환경로 42 (경서동) 종합환경연구단지 국립생물자원관
(72) 발명자
노현수
경상남도 진주시 신안들말길 17 (신안동, 주공1차아파트 104동 103호)
강현우
경상남도 진주시 가좌길29번길 63 (가좌동 미생물학과)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김남식, 양기혁, 한윤호, 이인행

전체 청구항 수 : 총 2 항

(54) 발명의 명칭 **합성염료를 분해하는 Pleurotus ostreatus IUM 1873 균주**

(57) 요 약

본 발명은 난분해성 염색 폐수를 분해하는 생물학적 방법을 제공하기 위하여, *Pleurotus ostreatus* IUM 1873 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 함유하는 합성염료 제거용 조성물을 제공한다.

대 표 도 - 도1



느타리버섯

(72) 발명자

김상우

경상남도 진주시 가좌길29번길 63 (가좌동)

김순옥

인천광역시 서구 난지로 42(경서동 종합환경연구단지)

곽명해

인천광역시 서구 난지로 42(경서동 종합환경연구단지)

오경희

인천광역시 서구 난지로 42(경서동 종합환경연구단지)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	03-2011-0064
부처명	환경부
연구사업명	주요 생물자원의 유전자 분석·연구
연구과제명	자생 생물자원으로부터 난분해성 물질 분해효소 유전자 발굴 활용 연구
기 여 율	1/1
주관기관	국립생물자원관
연구기간	2011.03.08 ~ 2012.01.07

특허청구의 범위

청구항 1

Pleurotus ostreatus IUM 1873 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 함유하는 합성염료 제거용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 합성염료는 로즈벵갈(rose bengal), 크리스탈 바이올렛(crystal violet), 말라카이트그린(malachite green), 메틸렌블루(methylene blue), 콩고레드(congo red) 또는 알리자린 레드 에스(alizarin red s)인, *Pleurotus ostreatus* IUM 1873 균주.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 난분해성 다환 방향족 탄화수소 분해능이 있는 자생 생물자원에 관한 것으로서, 더 상세하게는 합성염료를 분해하는 *Pleurotus ostreatus* IUM 1873 균주에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 석유화학기반 산업에 의하여 발생하는 오염물질 중 다환 방향족 탄화수소(polycyclic aromatic hydrocarbon, PAH)는 심각한 오염물질로서, 미국 EPA에 의하여 주요 오염물질로 지정되어 있고, BTEX(Benzne, Toluene, Ethylbenzene, Xylene)와 더불어 주요 공해물질로 인식되고 있다. PAH는 분해가 매우 힘든 난분해성, 소수성 물질이며, 대기 중으로 디젤입자(diesel particle)나 반휘발성(semi-volatile) 물질의 상태로 배출되며, 이들은 토양에 스며들어 궁극적으로는 지하수를 통하여 사람에게 흡수되어(Cerniglia CE., Biodegradation of PAHs, 3(3), 351~368, 1992), 발암 또는 형아 출산을 유발한다고 알려져 있다.

[0003] 전 세계적으로 분해가 어려운 탄화수소(aromatic hycrocarbon)로 되어있는 석유화학제품, 농약, PCB 등의 이들 물질에 의한 오염은 그 면적이 광범위하여, 물리적 또는 화학적 방법으로 오염을 제거하려면 천문학적인 비용이 발생한다. 일반적으로 넓고 깊은 면적의 오염처리는 오염현장에서 in situ remediation 방법을 사용하는 것이 가장 비용이 적게 든다. 현재까지 생물에 의한 in situ bioremedication에서 세균 및 식물을 제한적으로 사용하고 있으나, 광범위한 토양의 오염처리에는 효율적이지 못하다(Sack *et al., FEMS Microbiol. Lett.* 152(2), 227-34, 1997). 더구나 석유와 중금속이 복합 오염된 중화학 공단과 군사기지 토양에서는 중유(heavy oil)와 중금속을 동시에 제거해야 하나, 현재는 이들을 모두 제거하지 못하는 기술적인 한계가 있다.

[0004] 합성염료는 주로 섬유산업에서 많이 사용되고 있으며, 수질오염의 원인이 되고 있다. 이러한 합성염료 또한 난분해성 탄화소수로서, 세균에 의해 분해되기 어려우 물질로 알려져 있다. 특히, 말라카이트그린(malachite green)은 살균력 있는 녹색 염료로써 원래는 섬유 등의 염색, 및 항균, 항생 효과가 있어서 수족관이나 양식장에서 주로 사용되었으나, 체내 침투 시 해소(용해)되지 않고 축적되어 암을 유발할 수 있는 것으로 보고되고 있다. 또한, 이들의 분해가 중요 이슈가 되고 있다(Yan K. *et al., J.Microbiol. Biotechnol.*, 19(11), 1421-1430, 2009).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 포함하여 여러 문제점들을 해결하기 위한 것으로서, *Pleurotus ostreatus* IUM 1873 균주를 이용한 생물학적 합성염료 제거방법을 제공하는 것을 목적으로 한다. 그러나 이러한 과제는 예시적인 것으로, 이에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명의 일 관점에 따르면, *Pleurotus ostreatus* IUM 1873 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 함유하는 합성염료 제거용 조성물이 제공된다.

[0007] 상기 균주는 본 발명자에 의하여 합성염료에 대한 분해능이 최초로 입증된 *Pleurotus ostreatus* IUM 1873 균주로, 인천대학교 야생버섯균주은행으로부터 자유롭게 분양받을 수 있는 공지균주이다.

[0008] 상기 합성염료는 로즈벵갈(rose bengal), 크리스탈 바이올렛(crystal violet), 말라카이트그린(malachite green), 메틸렌블루(methylene blue), 콩고레드(congo red) 또는 알리자린 레드 에스(alizarin red s)일 수 있으며, 난분해성 탄화수소일 수 있다.

[0009] 본 발명의 다른 관점에 따르면, *Pleurotus ostreatus* IUM 1873 균주 또는 이의 배양액을 합성염료로 오염된 지역에 살포하는 단계를 포함하는, 합성염료의 제거방법이 제공된다.

[0010] 상기 합성염료는 로즈벵갈(rose bengal), 크리스탈 바이올렛(crystal violet), 말라카이트그린(malachite green), 메틸렌블루(methylene blue), 콩고레드(congo red) 또는 알리자린 레드 에스(alizarin red s)일 수 있으며, 난분해성 탄화수소일 수 있다.

[0011] 본 발명의 또 다른 관점에 따르면, *Pleurotus ostreatus* IUM 1873 균주를 배양하고 있는 배지에 합성염료로 오염된 폐수를 처리하는 단계를 포함하는 합성염료로 오염된 폐수로부터 합성염료의 제거방법이 제공된다.

[0012] 상기 합성염료는 로즈벵갈(rose bengal), 크리스탈 바이올렛(crystal violet), 말라카이트그린(malachite green), 메틸렌블루(methylene blue), 콩고레드(congo red) 또는 알리자린 레드 에스(alizarin red s)일 수 있으며, 난분해성 탄화수소일 수 있다.

[0013] 상기 제거방법에 있어서, 합성염료로 오염된 지역은 섬유산업 폐기물에 의하여 오염된 지하수, 해양, 해안가, 및 수족관 양식장 등일 수 있다.

발명의 효과

[0014] 상기한 바와 같이 이루어진 본 발명의 일 실시예에 따르면, *Pleurotus ostreatus* IUM 1873 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 함유하는 합성염료 제거용 조성물을 구현할 수 있다. 물론 이러한 효과에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 디젤오일이 함유된 톱밥배지에서 자실체를 형성한 *Pleurotus ostreatus* IUM 1873 균주를 촬영한 사진이다.

도 2는 합성염료가 포함된 PDA 배지에서 *Pleurotus ostreatus* IUM 1873 균주의 성장정도를 촬영한 사진이다.

도 3은 말라카이트그린(malachite green) 염료가 포함된 PDB 배지에서 *Pleurotus ostreatus* IUM 1873 균주의 성장에 따른 상기 염료의 분해정도를 HPLC를 이용하여 확인한 그래프로서, 균주의 배양 시작(도 3A) 및 균주 배양 3일 후(도 3B)의 말라카이트그린의 분해정도를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 이하, 첨부된 도면들을 참조하여 본 발명의 실시예를 설명하면 다음과 같다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 도면에 도시된 실시예에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있는 것으로, 이하의 도면에 도시된 실시예는 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이다. 또한 설명의 편의를 위하여 도면에서는 구성 요소들이 그 크기가 과장 또는 축소될 수 있다.

[0017] 도 1은 디젤오일이 함유된 톱밥배지에서 자실체를 형성한 *Pleurotus ostreatus* IUM 1873 균주를 촬영한 사진이다. 본 발명의 일 실시예에서 난분해성 다환 방향족 탄화수소의 함량이 높은 디젤 오일이 함유된 배지를 이용하여 *Pleurotus ostreatus* 균주의 PAH 분해능을 균주의 성장정도에 따라 확인하였다. *Pleurotus ostreatus* 균주는 디젤이 함유된 PDA, PDB, 및 톱밥 배지에서 성장이 우수하였으며, 도 1에 나타난 바와 같이 자실체를 형성하였다. 이와 같은 특성은 향후 *Pleurotus ostreatus* IUM 1873 균주를 생물복원에 유용하게 활용할 수 있음을 입증하는 것이다.

[0018] 도 2는 합성염료가 포함된 PDA 배지에서 *Pleurotus ostreatus* IUM 1873 균주의 성장정도를 촬영한 사진이다. 본 발명의 일 실시예를 통하여 디젤오일이 함유된 배지 내에서 우수한 성장을 나타낸 *Pleurotus ostreatus* IUM 1873 균주를 난분해성 탄화수소의 일종인 합성염료가 함유된 배지에서 배양함으로써, 상기 합성염료에 대한 분해능을 확인하였다. 구체적으로 로즈벵갈(rose bengal), 크리스탈 바이올렛(crystal violet) 및 말라카이트그린(malachite green)을 함유한 PDA 배지에서 *Pleurotus ostreatus* IUM 1873 균주를 7일 동안 배양한 후, 성장정도를 확인한 결과, *Pleurotus ostreatus* 스트레인 가운데 IUM 1873 균주만이 트리페닐 메탄(triphenyl methane)계 염료에 대한 분해능을 나타냈다.

[0019] 도 3은 말라카이트그린(malachite green) 염료가 포함된 PDB 배지에서 *Pleurotus ostreatus* IUM 1873 균주의 성장에 따른 상기 염료의 분해정도를 HPLC를 이용하여 확인한 그래프로서, 균주의 배양 시작(도 3A) 및 균주 배양 3일 후(도 3B)의 말라카이트그린의 분해정도를 나타낸 그래프이다. 상기 도 2에서 확인된 *Pleurotus ostreatus* IUM 1873 균주의 트리페닐 메탄계열의 염료에 대한 분해능이 균주의 성장에 의한 것인지 확인하기 위하여, 말라카이트그린 염료가 포함된 PDB 배지에서 *Pleurotus ostreatus* IUM 1873 균주를 3일 동안 배양한 후, HPLC 분석을 통하여 배지내에 잔존하는 말라카이트그린의 함량을 측정하였다. 그 결과, 배양초기에 확인된 말라카이트그린 염료가 배양 후, 관찰되지 않았으며, 이러한 결과는 본 발명의 일 실시예에 따른 *Pleurotus ostreatus* IUM 1873 균주의 성장에 의하여 난분해성 트리메틸메탄 염료가 분해될 수 있음을 입증하는 것이다.

[0020] 이하, 실시예 및 실험예를 통하여 본 발명을 더 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예 및 실험예에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있는 것으로, 이하의 실시예 및 실험예는 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이다.

[0021] **실시예 1: *Pleurotus ostreatus* IUM 1873 균주의 배양**

[0022] *Pleurotus ostreatus* 균주는 인천대학교 야생버섯균주은행으로부터 분양받았으며, 구체적으로 IUM 0159, 1343, 1386, 1746, 및 1873 스트레인을 분양받았다. 상기 균주는 PDA(Potato Dextrose Agar) 배지에서 배양하였다. 상기 PDA배지는 포테이토(potato) 약 200g과 박토덱스트로스(bacto dextrose) 약 20g 및 박토아가(bacto agar) 약 15g을 포함하는 배지이다. *Pleurotus ostreatus* 균주를 PDA 배지에서 25℃의 배양온도에서 7일 이상 배양하였다.

[0023] **실험예 1: 디젤 오일 첨가배지에서 야생버섯 균주의 성장**

[0024] 본 발명자는 난분해성 PAH 분해능이 있는 야생균주를 선별하기 위하여, 디젤오일이 첨가된 톱밥배지, PDA, PD broth에 인천대학교 야생버섯균주은행으로부터 분양받은 야생버섯 균을 접종하여 25℃에서 배양하며 균사의 성장을 관찰하였다.

[0025] 톱밥배지의 경우, 200 g 포플러 톱밥(80% 상대습도)에 3%(v/wt) 디젤오일을 첨가하고 혼합한 후, 50 ㎖ PDA 배지에서 배양한 버섯균을 접종하였다. PDA 배지의 경우에는 PDA 배지에 0.5 ml 디젤오일을 도말한 후, 각 버섯균사블락(block)을 접종하였다. 액체 배지의 경우, PDB 200 ml에 6 ml 디젤오일을 첨가하여 제조하였다. 상기 각각의 배지에 야생버섯 균을 접종한 후, 7일간 25℃, 암조건에서 배양하였다.

[0026] 3% 디젤오일의 존재 하에서 톱밥배지, PDA, PDB 배지에서에서의 버섯균의 성장을 조사한 결과, 배지의 종류에 상관없이 유사한 패턴의 성장이 관찰되었다. PDA에서의 성장을 기준으로 3% 디젤오일의 존재 하에서 버섯균을 5일 정도 배양한 후, 균사체의 직경을 기준으로 성장정도를 판단하였다. 그 결과, 하기 표 1에 기재된 바와 같이 *Pleurotus ostreatus* 균주의 스트레인에 따라서 디젤오일이 첨가된 배지 내에서의 성장이 차이가 있으며, *Pleurotus ostreatus* IUM 1873 균주의 성장률이 가장 우수함을 확인할 수 있었다. 하기 표 1은 균사체의 직경을 측정한 결과이다.

[0027] 또한, 1개월 가량 디젤이 함유된 배지에서 배양하였을 때에 자실체를 형성하는 것이 관찰되었다. 이러한 특성은 향후 *Pleurotus ostreatus* 균주를 생물복원에 활용할 수 있음을 입증하는 성장특성이라고 볼 수 있다(도 1 참조).

표 1

[0028]

균주번호	균주명	성장특성(cm)
IUM 0159	*Pleurotus ostreatus*	2.6
IUM 1343	Pleurotus ostreatus	3.8
IUM 1386	Pleurotus ostreatus	4.8
IUM 1746	Pleurotus ostreatus	4.8
IUM 1873	Pleurotus ostreatus	6.6

[0029] **실험예 2: 합성염료의 분해능 분석**

[0030] *Pleurotus ostreatus* 균주 합성염료 분해능을 조사하기 위하여, 50 ppm 농도의 합성염료들이 함유된 PDA 배지를 제작하였다. 합성염료로는 로즈벵갈(rose bengal), 크리스탈 바이올렛(crystal violet), 말라카이트그린(malachite green), 메틸렌블루(methylene blue), 콩고레드(congo red), 및 알리자린 레드 에스(alizarin red s)를 이용하였다. 균사가 포함된 아가 블락(agar block)을 접종한 후, 25℃에서 7 일간 배양하며 균사의 성장과 염료의 탈색정도(dye decolorization)을 조사하였다.

[0031] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이 *Pleurotus ostreatus* 균주 가운데, IUM 1873 균주가 로즈벵갈(rose bengal), 크리스탈 바이올렛(crystal violet), 또는 말라카이트그린(malachite green)이 포함된 배지에서 우수한 성장을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 IUM 1873 균주 이외의 균주는 트리페닐 메탄(triphenyl methane)계의 염료인 크리스탈 바이올렛, 말라카이트그린이 포함된 배지에서 성장이 매우 저조하였다. 이러한 결과는 상기 트리페닐 메탄 계열 염료의 항균활성에 의한 것으로 판단되었다. 트리페닐 메탄 계열 염료의 존재하에서도 균주의 성장이 관찰된 다는 것은 상기 트리페닐 메탄 계열 염료에 대한 분해능을 반증하는 것이다(표 2 참조). 이때, 성장정도는 아가(agar)배지 상에서 7일간 배양한 후 균사의 지름을 측정한 값이다.

표 2

[0032]

	균사의 성장정도 (cm)					
Number	알리자린 레드 에스(alizarin red s)	콩고레드(congo red)	메틸렌블루(methylene blue)	말라카이트그린(malachite green)	크리스탈 바이올렛(crystal violet)	로즈벵갈(rose bengal)
IUM 0159	7.1	6.9	10	0	0	8.3
IUM 1343	8.5	9	7.2	0.5	0.5	7.8
IUM 1386	8.3	1.8	8.5	1.5	1.2	10
IUM 1746	6.4	8.5	8.5	0	5.1	7.5
IUM 1873	10	10	10	9.5	9.5	10

[0033] 이어, 본 발명자는 합성염료 분해능이 가장 우수한 *Pleurotus ostreatus* 1873 균주의 트리페닐 메탄계 염료의 분해능이 상기 균주의 성장에 의하여 기인한 것인지 확인하기 위하여, 50 ppm 말라카이트그린(malachite green)이 포함된 PDB 배지에서 *Pleurotus ostreatus* 1873 균주를 3일간 배양한 후, HPLC를 이용하여 분석하였다.

[0034] 그 결과, 도 3(3A: 배양전, 3B: 배양후)에 나타난 바와 같이 배양 3일 후 말라카이트그린이 모두 분해되는 것을 확인할 수 있었다. 즉, 크리스탈 바이올렛, 말라카이트그린이 포함된 배지에서 *Pleurotus ostreatus* 1873 균주의 성장이 상기 염료의 분해를 동반하며 일어난다는 것을 의미한다(도 3 참조).

[0035] **<제제예 1> 미생물제제의 제조**

[0036] **<1-1> 수화제의 제조**

[0037] 본 발명자들은 상기 실험예 2에서 합성염료 분해능을 확인한 *Pleurotus ostreatus* IUM 1873 균주 또는 이의 배양액을 이용하여 합성염료 제거용 미생물 제제를 제조하기 위해, 안정적인 제제화를 목적으로 분상으로서 물에 희석하였을 때 수화되는 수화제를 제조하였다. 구체적으로, 수화제는 고체배지를 가온, 건조한 후 계면활성제 및 증량제를 첨가하여 분쇄하였다. 즉, 원분을 70℃의 건조기 내에서 2시간 가량 건조하여 분쇄하였다. 그 다음에 조분쇄물, 계면활성제 및 증량제를 골고루 섞어 혼합하였다. 혼합물을 제트-오-밀(Jet-Omill; Aljet 사

제품)을 통과시켜 분쇄하고 분쇄분은 수화성을 검사한 후 수화제 형태의 미생물제제를 제조하였다.

[0038] **<1-2> 입제의 제조**

[0039] 본 발명자들은 *Pleurotus ostreatus* IUM 1873 균주 또는 이의 배양액을 이용한 미생물 제제의 안정적인 제제화를 목적으로 입상으로 원상태대로 사용할 수 있는 입제를 제조하였다. 구체적으로, 입제는 원분을 70℃의 건조기 내에서 2시간 가량 건조하여 분쇄하였다. 분쇄분은 제트-O-밀을 통과시켜 분쇄한 다음, 미생물 분쇄분, 계면활성제, 증량제/영양제 및 붕해제를 균주의 포자 50%, 폴리카르복실레이트 3%, 소듐리그노설포네이트 3%, 소듐다이알킬 설포석시네이트 1%, 전분 10%, 벤토나이트20%, 탈크 13%로 구성으로 혼합하여 혼합분의 전체 분체량의 35% 정도로 가수하고 반죽을 하였다.

[0040] 반죽이 끝난 후 조립기를 이용하여 입제화(지름 1 mm, 길이 1-5 mm)하고 70℃의 건조기 내에서 건조하였다. 건조물은 16-30 메쉬(mesh) 체를 통과 시켜 분제를 제거한 후 입제를 제조하였다.

[0041] **<1-3> 캡슐화 제형의 제조**

[0042] 본 발명자들은 *Pleurotus ostreatus* IUM 1873 균주 또는 이의 배양액을 이용한 미생물 제제의 안정적인 제제화를 목적으로 캡슐화 제형을 제조하고자 하였다. 구체적으로, 콩가루 11%, 녹두 6%, 쌀가루 4%, 감자전분 4%, 호밀가루 4%, 황토흙 3%을 섞어 121℃에서 20분간 가압멸균을 하고 난 다음 식기 전에 다시 완전히 섞어 찬물에서 냉각시켰다. 교반기에서(d=5cm, 200 rpm 이상) 10분 이상 완전히 섞어준 후, 교반이 계속되는 상태에서 첨가제와 *Pleurotus ostreatus* IUM 1873 균주 또는 이의 배양액을 넣고 완전히 섞어 미생물 살균 캡슐화 제형을 제조하였다.

[0043] 본 발명은 도면에 도시된 실시예를 참고로 설명되었으나 이는 예시적인 것에 불과하며, 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 이로부터 다양한 변형 및 균등한 다른 실시예가 가능하다는 점을 이해할 것이다. 따라서 본 발명의 진정한 기술적 보호 범위는 첨부된 특허청구범위의 기술적 사상에 의하여 정해져야 할 것이다.

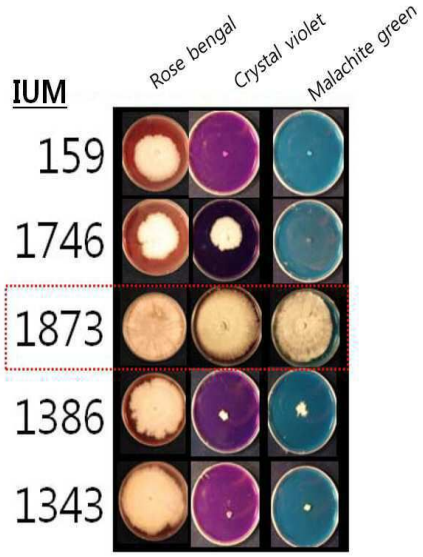
도면

도면1

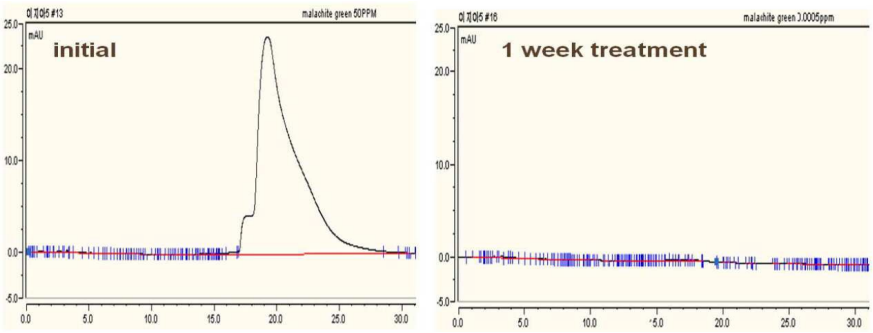


느타리버섯

도면2


IUM
Rose bengal
Crystal violet
Malachite green
159
1746
1873
1386
1343

도면3


initial
1 week treatment