

*Tyromyces palustris*를 이용한 구리의 제거*¹

손 동 원*² · 이 동 흡*² · 강 창 호*²

Copper Uptake by *Tyromyces palustris**¹

Dong-Weon Son*² · Dong-Heub Lee*² · Chang-Ho Kang*²

ABSTRACT

In this research, the removal or uptake of heavy metals such as coppers by using oxalic acid metabolism of wood rot fungi, *Tyromyces palustris* were endeavored.

As results, the addition of oxalic acid to copper containing culture did not cause the mycelium growth, but *Tyromyces palustris* was able to grow in this culture without inhibition. *Tyromyces palustris* grew with the circular halo type in copper containing culture, and this type was formed as collectives after examining by microscope, and considered as copper oxalates by analyzing FT-IR comparison experiment with standards. According to this result, *Tyromyces palustris* has secreted oxalic acid during incubation, this secreted oxalic acid was combined with coppers, and formed copper oxalates by chelating reactions. In other words, the oxalic acid was might be as non-toxifying agent of coppers in medium.

By using this copper removal mechanisms, *Tyromyces palustris* immobilized sawdust was used in bench scale air lift system for removing coppers. The added coppers were almost removed from the system within 72hrs.

Therefore, this nonenzymatic wood degradation mechanism may give a possibility for removing coppers from copper containing waste water.

Keywords : *Tyromyces palustris*, oxalic acid metabolism, clarification, wastewater, copper uptake

1. 서 론

전세계적으로 약 6만종의 화학품이 일상생활에서 쓰여지고 있으며, 매년 신중 화학물질이 200~1,000종 정도 증가되는 추세이다. 이러한 물질은 제조 및 사용과정중 화학 또는 생물학적으로 환경정화 처리가 되지 않은, 즉 수계방류기준 이상인 상태에서 수계로 방류되기 때문에 환경중 축적농도가 매년 증가 추세

에 있다(이 등, 1994).

일반적으로 중금속원소들은 자연상태에서 저농도의 상태로 수중이나 토양에 널리 분포하고 있으나 산업의 발달과 함께 자연환경이 급속하게 오염되면서 그 농도가 자연상태보다 2~3배 높게 나타나고 있으며 심한 경우는 90배가 넘는다고 한다.

이들 중금속 중 구리는 주로 그 발생원이 동판, 동선, 도금공장, 동광산 폐액 등 기초산업분야가 대부분이며, 과다하게 인체에 노출되면 급성일 경우에는

*1 접수 1997년 12월 1일 Received December 1, 1997

*2 임업연구원 Forestry Research Institute, Seoul 130-012, Korea

집막자극, 구토, 설사, 간장장애를 일으키며 만성질환으로서는 간장장애와 소화기관 장애를 가져온다고 한다(차, 1992).

중금속에 오염된 물을 정화하는 방법으로 주로 물리, 화학적 처리가 이용되고 있다. 그러나 이러한 처리는 설치 및 운전이 많은 비용이 소요되고, 물리적 정화능력의 한계점과 화학약품의 과다한 사용이 2차적인 오염을 유도하고 있다. 그러나 미생물이나 생물자원을 이용한 친환경적인 처리방법을 적용하면 2차적인 수질오염의 문제를 해결할 수 있기 때문에 최근 생물적 처리 방법에 관심이 집중되고 있다.

목재부후균중 갈색부후균은 성장하면서 대사물질인 수산을 균체외로 분비하는 특징을 갖고 있다. 여기에서 균체외에 축적된 수산은 비효소적 작용으로 목재섬유를 분해하여 효소가수분해를 돕는 것으로 알려졌다(Geoffrey, 1988; Kathleen, 1980; Suzanne, 1987; Wilson, 1983)

본 연구에서는 갈색부후균이 균체외로 분비하는 수산을 이용하여 수계에 방류되는 폐액 중의 구리를 제거시키는 것을 목표로 하였으며 그 제거 메커니즘과 실제 공정에서 응용이 가능한 소형 air-lift정화조에서 수질 정화능을 검토하여 보았다.

2. 재료 및 방법

2.1 공시재료

공시균으로는 갈색부후균인 *Tyromyces palustris* (FRI 21055, 부후개떡버섯), *Laetiporus sulphureus* (FRI 20631, 덕다리버섯), *Gloeophyllum trabeum* (FRI 20652), *Daedalea dickinsii* (FRI 20323, 등갈색송편버섯), *Fomitopsis pinicola* (FRI 20414, 소나무잔나비버섯), *Serpula lacrymans* (FRI 20965, 버즘버섯), *Lentinus lepideus* (FRI 20641, 잣버섯)을 사용하였다.

2.2 배양기

배양기는 glucose 25g, malt extract 10g, peptone 5g, KH_2PO_4 0.3g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g을 증류수에 녹여 전량이 1,000ml가 되게 하고 pH 5.6으로 조정하였으며, 고행배양기는 위의 배양액 1,000ml에 한천 20g을 첨가하여 사용하였다. Air-lift정화조실험에 사용할 톱밥담체로 신갈나무 톱밥 8kg에 미강 2kg, 설탕 300g, KNO_3 40g, CaCO_2 60g을 첨가하여 11×13×21cm 크기로 압출제작 후,

폴리에틸렌 비닐팩에 넣고, 멸균·접종한 후 26℃, 70%에서 90일간 배양하여 톱밥의 목질 세포벽 내부에 균사가 충분히 성장한 것을 사용하였다.

2.3 방법

2.3.1 배양액 중의 pH, 균체량, oxalate량 측정

배양액 중의 pH, 균체량, oxalate 측정은 평판배지에서 미리 배양한 공시균을 코르크볼러(6mm)로 찍어 낸 것을 공시배양액 100ml를 넣은 500ml용 진탕플라스크에 5조각씩 넣어 26℃, 120rpm으로 왕복진탕배양하였다. 진탕배양액에서 생성된 수산의 생성량 측정은 배지여과액을 NH_4OH 로 알칼리성으로 만들고, 여과액 중의 수산은 CaCl_2 용액의 첨가로 침전시켰다. 이를 원심분리하고 모아진 침전물을 묽은 H_2SO_4 로 용해시키고 수산량을 1/10N- KMnO_4 로 적정하여 산출하였다. 공시균의 수산 생성량을 5일 간격으로 측정 비교하였다. pH 미터로 배양액의 pH를 측정하고, 균체량은 배양기 중의 균체를 여과 분리하고 건조중량으로 결정하였다.

2.3.2 수산착염 및 구리분석

수산과 결합한 착염의 화학분석과 리액터상에서의 구리 제거율을 보기 위하여, 수산착염의 분석에 NICOLET 800 FT-IR spectrometer를 사용하였으며, 구리의 분석은 여과액을 여과지(No.2)로 걸러 원자흡광광도계(SUNIL Co.)를 사용하여 정량하였다.

2.3.3 Air-lift bioreactor 적용시험

갈색부후균의 구리내성 메커니즘을 적용하여 실질적인 air-lift reactor상에서의 효율을 측정하고자, 직경 9cm, 길이 40cm의 bio-reactor를 실험실에서 제작하여 사용하였다. Reactor에 사용한 공기발생용 모터는 대광전자 3w 관상어용 전기기포 발생기를 사용하였다. 그 사용예는 Fig. 1, 2와 같다.

3. 결과 및 고찰

3.1 갈색부후균의 수산생성량 비교

갈색부후균이 생성하는 수산은 목재 초기분해에서 셀룰로오스 성분을 분해하여 중량감소에 비하여 큰 강도감소를 유발시키는 가능성이 있다고 보고되어 있다(손 등, 1996). 이 등(1995)의 연구에 의하면 백색부후균 FRI 20621의 Cr제거에 있어 수산을 첨가하면 그 제거율이 현저히 증가한다고 보고하였다. 이는 목재 부후균이 중금속을 제거하는 기작에 수산을 이용함을 의미하므로 수산생성균인 갈색부후균에서

Fig. 1. Air lift bioreactor filled with *T. palustris* immobilized sawdust.

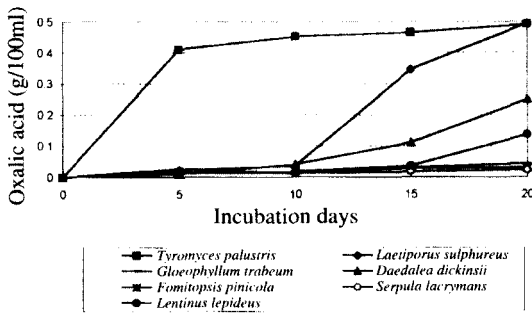


Fig. 3. The amount of oxalic acid produced by brown-rot fungi

생성하는 수산을 직접 중금속제거에 응용하고자, 먼저 수산생성량을 몇가지 갈색부후균을 대상으로 비교하여 Fig. 3에 나타내었다. 배양20일 이후 수산생성량은 *T. palustris* > *L. sulphureus* > *D. dickinsii* > *L. lepideus* > *G. trabeum* > *F. pinicola* > *S. lacrymans* 순으로 갈색부후균 중에서도 *T. palustris*의 수산생성능은 매우 높았으며 그것도 배양초기인 5일 전후에서 수산 한계생성량을 나타냈다. 반면 *L. sulphureus*는 배양초기에는 수산생성량이 *T. palustris*보다 낮았으나 배양 20일 이후는 동등한 수산생성이 확인되었다.

3.2 Cu 2000ppm이 첨가된 배지에서의 균사의 성장량

수산의 생성량이 많다고 하여도 그 균주가 중금속에 대하여 내성을 갖지 못하는 경우가 발생할 수 있으므로 수산생성균주가 구리첨가배지에서 생장이 가

Fig. 2. Air lift bioreactor filled with *T. palustris* shaking incubated mycelium.

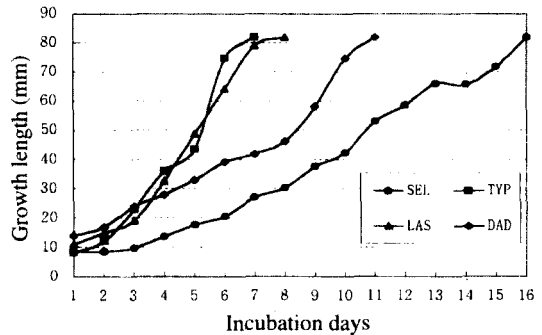


Fig. 4. The growth length of brown-rot fungi on copper containing culture(2000ppm).

능한지를 조사하기 위하여 공시균주로 총 배지액에 대하여 Cu 2000ppm이 되도록 조제하여 균사를 접종하고 그 성장량을 측정하여 Fig. 4에 나타내었다. 균사성장량은 *T. palustris* > *L. sulphureus* > *D. dickinsii* > *S. lacrymans*의 순이었으며, 수산의 생성량이 많은 순으로 구리에 대한 내성도 높게 나타났다. 그러나 *L. sulphureus*는 초기 수산생성능력이 *T. palustris*보다 떨어지지만 구리에 대한 균성장내성은 거의 같은 수준으로 나타났다. 수산생성량과 구리내성에 있어서 *T. palustris*가 가장 우수하였기 때문에 이후 수산대사와 구리제거의 실험에 *T. palustris*를 사용하였다.

3.3 구리가 첨가된 고체배지에서 수산의 첨가와 균사 성장과의 관계

수산은 균 생리대사물질로 분비되지만, 이(1995)

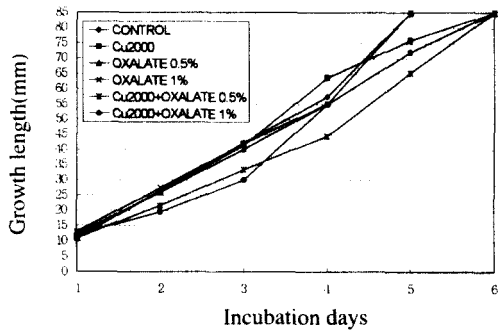


Fig. 5. The fungi growth length of *T. palustris* on copper containing culture with the addition of oxalic acid

는 수산을 별도로 균생리대사 촉진물질로 사용한 바 있으므로, 수산을 생리대사물질로 직접 첨가하였을 경우에 수산과 *T. palustris*의 성장관계를 비교할 필요가 있다. 따라서 무처리 배지에 수산을 0.5%, 1%를 각각 첨가하고, Cu 2000ppm을 첨가한 배지에 수산 0.5%, 1%를 각각 첨가하여 구리가 첨가된 배지에서의 균사생장량을 검토하고 Fig. 5에 고체 배지에 수산을 첨가하였을 경우, 균사의 성장량을 나타내었다.

고체 배지에서는 특별히 수산을 첨가하였을 때 균사 성장량의 차이는 없었으며, Cu 2000ppm배지와 Cu 2000ppm배지에 수산을 첨가하였을 때도 균사생장량에 대한 차이는 없었다. 이는 *T. palustris*가 배지 중에 생성하는 수산의 양이 구리를 제거하는데 충분하였기 때문으로 추정되며, 첨가해준 수산은 균생장이나 중금속제거에 도움이 되지 않는 것으로 판단된다.

3.4 액체배지에서 수산의 첨가와 균사 성장과의 관계

균을 실제 폐수정화에 응용하기 위해서는 액체배지에서의 검토가 필요하기에, 액체진탕배지에서 수산의 첨가와 갈색부후균의 성장관계를 검토하여 Fig. 6에 나타내었다. 구리 2000에 균사조각을 바로 넣었을 경우에는 균사의 생장은 없었다. 중금속을 첨가하기 위해서는 충분히 균사의

활력을 키울 필요가 있겠다. 그러나 수산을 첨가하였을 경우에는 균사조각을 바로 넣어도 그 생장의 정도가 무처리배지와 비슷하였으며, 이는 배양기에 첨가해준 수산이 구리를 킬레이트하여 배양기내의 중금속을 무독화시켰기 때문으로 판단된다.

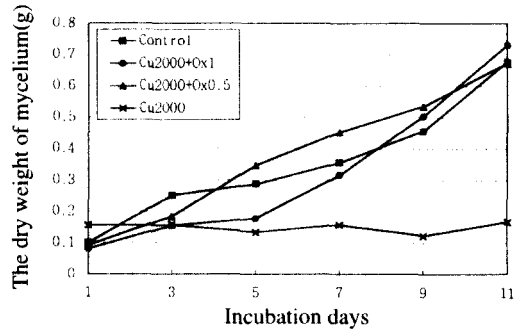


Fig. 6. The fungal dry weight of *T. palustris* on the liquid media added by oxalic acid and copper

3.5 균사와 Cu의 결합관계

구리가 첨가된 배지에서의 *T. palustris*에 의한 구리의 제거 현상이 물리적인 흡착의 경우인지 아니면 화학적인 결합인지를 확인하기 위하여 Fig. 7과 같이 구리 첨가배지에서 균사가 성장한배지를 덮고 있는 부분, 둥근띠를 형성하고 있는 부분 둥근띠 부분의 바깥부분을 균사와 함께 걸어내어 고형화시킨 후 분말상의 시료로 만들어 IR 분석을 하였다.

분석 결과는 Fig. 8, 9, 10과 같으며 IR spectrum에서 보듯이 이온 결합이라고 볼 수 있는 피크의 변화가 나타나지 않았기 때문에, 균과 중금속의 어떤 화학적 결합은 없는 것으로 판단되어지고, 중금속이 첨가된 배지에서 균이 성장하는 것은 수산과 같은 균대사 물질에 의한 중금속이 수산과 착염체를 형성하고 이를 배지에 침전시키거나, 균사내의 물리적인 흡착으로 사료되어 진다.

3.6 Cu가 첨가된 배지에서 *T. palustris*가 성장하면서 형성하는 물질 관찰

*T. palustris*가 Cu 2000ppm이 첨가된 평판배지 상에서 성장하면서 Fig. 11과 같이 원형의 띠 형성하였는데, 이 부분을 떼어내어 현미경에서 관찰하였다. Fig. 12와 같이 균사에 달라 붙지 않고 배지상에 형성되어진 고형물을 관찰할 수 있었다.

3.7 구리가 첨가된 배지에서 *T. palustris*가 성장하면서 형성하는 물질 분석

구리첨가 배지에서 형성되는 고형물을 분석하기 위하여 둥근부분만을 걸어내어 Kjeldahl flask에 질산과 함께 넣고 유기물을 충분히 태운 후 침전물을 증류수로 여러번 씻고 원심분리하여 얻어진 침전물을 50

Fig. 7. Sampling

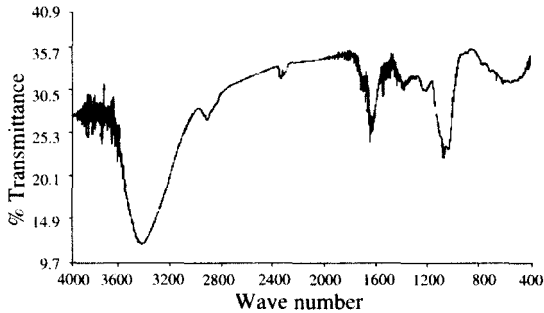


Fig. 9. The IR spectrum of part ② in Fig. 7.

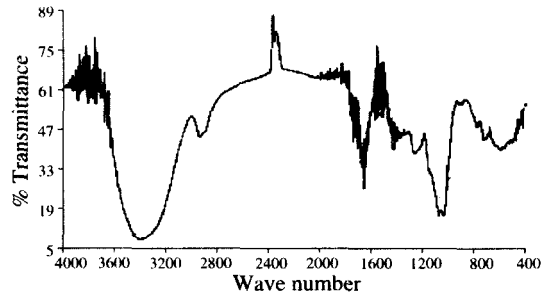


Fig. 8. The IR spectrum of part ① in Fig. 7.

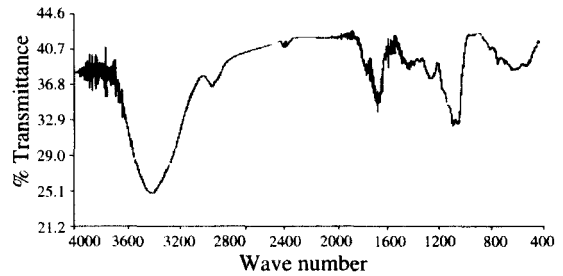


Fig. 10. The IR spectrum of part ③ in Fig. 7.

Fig. 11. The halo of copper containing culture by *T. palustris* after incubation.

℃에서 건조하여 IR 분석을 하였고 Fig. 13에 이 물질의 FT-IR 그림을 나타내었다. Fig. 14는 oxalic acid 1%와 CuSO₄ 1%와의 혼합액에서 형성된 물질의 FT-IR의 spectrum이다. 이 두 spectrum을 비교하여 본 결과 주요 흡수대, 3500cm⁻¹(OH기), 1650cm⁻¹(C=O기), 1350cm⁻¹(C-H alkane)에서 동일함을 확인하였다. 구리첨가 배지에서 *T. palustris*가 성장하면서 형성하는 물질은 수산동으로 사료되며, *T. palustris*는 구리첨가 배지에서 성장하면서 생리대사물질인 수산을 배지에 배출하여 구리와 결합하여 수

Fig. 12. The collectives formed by *T. palustris* on the copper containing culture (× 400).

산동을 형성함으로써 구리의 독성을 무독화 시켜 생장할 수 있는 것으로 판단된다.

3.8 Bio-reactor 적용시험

이상의 실험에서 밝혀진 구리배지에서 갈색부후균 *T. palustris*의 수산생성과 구리제어에 관한 기작을 직접적인 수질정화 시스템에 적용해 보기 위하여, 실험실에서 제작한 air-lift bioreactor에 적용하였다. air-lift bioreactor에 *T. palustris* 균사를 톱밥에 만연시킨 톱밥담체와, *T. palustris*의 균사로 각각 채

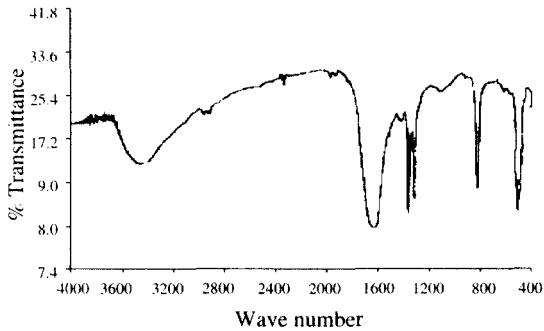


Fig. 13. The IR spectrum of collectives formed by *T. palustris* grown in copper containing medium

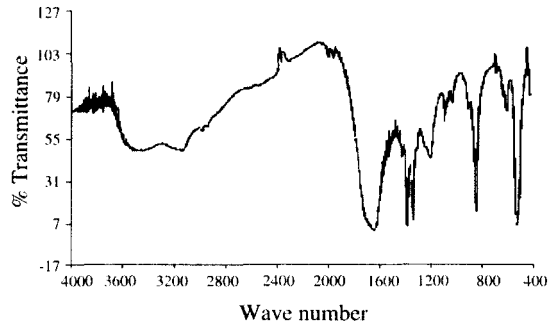


Fig. 14. The IR spectrum of copper and oxalic acid complex.

Fig. 15. The uptake of copper in air lift bioreactor

우고 구리 제거능을 측정한 결과는 Fig. 15와 같다. 2000ppm의 구리수용액을 적용하여 3일경과 후, 톱밥균사를 이용한 bio-reactor에서는 34.4ppm으로, 균사만을 적용시킨 bio-reactor에서는 49.6ppm으로 농도가 줄어드는 등 99% 이상의 구리화합물이 제거됨이 밝혀졌다.

4. 결론

중금속의 생물학적 제거를 목표로 한 본 연구에서는 갈색부후균을 이용하여 그 제거능을 구명하고자 하였다. 생물학적 중금속제거에 수산을 비교적 많이 생성하는 *T. palustris*를 이용하여 본 결과, 이 균주는 성장하면서 배양액 속에 수산을 분비하며, 이 분비된 수산은 중금속인 구리를 킬레이트하여 수산동으로 만들고 이를 침전시킴으로써 구리가 첨가된 배양액 중의 구리의 독을 무독화시키면서 성장하는 메커니즘을 밝혔다.

이 메커니즘을 실험실용 air-lift bioreactor에서 적용시켜 본 결과 72시간 내에 2000ppm의 구리용액

을 99%이상 제거할 수 있음이 밝혀졌다. 이러한 *T. palustris*의 부후 전구물질인 수산의 비효소적 부후기작을 이용하면, 구리폐액의 제거가 가능하리라 판단된다.

참고 문헌

1. Geoffrey, M. G. and L. de Rome. 1988. Biosorption of copper by fungal melanin. *Applied Microbiology & Biotech.* 29 : 610~617
2. Kathleen, C. et al. 1980. Sorption of Copper and Lead by Hydrus Ferric Oxide. *Environmental Science & Tech.* 14(11) : 1326~1331
3. Suzanne, E. C., J. Stuart, and J. S. Loehr. 1987. Induction of Siderophore Activity in *Anabaena* spp. and Its Moderation of Copper Toxicity. *Applied & Environmental Microbiology* 53(5) : 917~922
4. Jardim, W. F., and H. W. Pearson. 1983. A study of the copper-complexing compounds released by some species of cyanobacteria. *Water research* 18(8) : 985~989
5. 손동원, 이동흡, 오정수. 1996. *Tyromyces palustris*의 수산생성효소인 Oxaloacetase와 목질 분해와의 관계 구명. *목재공학* 24(1):48~53
6. 이동흡. 1995. 목질 및 미생물에 의한 환경정화. 임업연구원 연구사업보고서 4-III : 99~121
7. 이병권, 김일권, 전영권. 1994. 지구환경문제와 보전대책. 법무사, 서울 : 107~123
8. 차영일. 1992. 식물에 의한 폐수 중의 Cd²⁺이온 제거에 관한 연구. *한국생태학회지* 15(2):137~146.