(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0075014
(43) 공개일자 2022년06월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) *C02F 3/34* (2017.01)
C12R 1/01 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/20 (2021.05)
C02F 3/34 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0161011
(22) 출원일자 2020년11월26일
심사청구일자 2020년11월26일

(71) 출원인
대한민국(환경부 국립생물자원관장)
인천 서구 환경로 42, 종합환경연구단지 국립생물자원관 (경서동)
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
주식회사 씨디아이
경기도 화성시 마도면 청원산단8길 129
(72) 발명자
허문석
인천광역시 서구 완정로34번길 20, 104동 204호 (마전동, 동아아파트)
박희등
경기도 성남시 분당구 정자일로 27, 코오롱더프라우아파트 1402호 (금곡동, 코오롱더프라우아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
안창우

전체 청구항 수 : 총 8 항

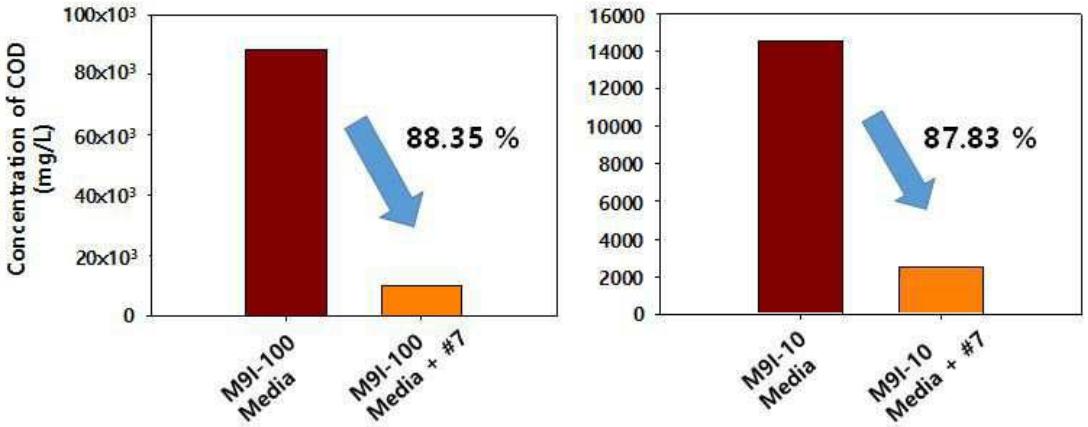
(54) 발명의 명칭 **이미노디프로피오니트릴 분해 활성을 갖는 파라코커스 속 균주 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 이미노디프로피오니트릴 분해 활성을 갖는 파라코커스 속 균주, 이를 포함하는 이미노디프로피오니트릴 생분해용 조성물, 및 이를 이용한 오폐수의 이미노디프로피오니트릴의 독성 제거 방법에 관한 것이다.

본 발명의 파라코커스 코뮤니스(*Paracoccus communis*) NK1007 균주는 100,000mg/L의 초고농도 이미노디프로피오니트릴을 함유한 오폐수 환경에서서도 지속적으로 자가 증식이 가능하며, 이미노디프로피오니트릴을 생분해 하는 활성이 우수하여 이미노디프로피오니트릴 오염 오폐수의 독성을 경감 또는 제거시키는데 유용하게 활용할 수 있다.

대 표 도 - 도4



(52) CPC특허분류
C12R 2001/01 (2021.05)
(72) 발명자
이상훈
서울특별시 강동구 천호대로 1240 프라자아파트 4동 803호
최기승
서울특별시 영등포구 여의대방로 25 102동 1902호 (신길도, 보라매 경남아너스빌)
정유정
인천광역시 서구 환경로 42(경서동 종합환경연구단지) 국립생물자원관 유용자원분석과
박혜윤
경기도 안양시 동안구 경수대로 610번길 36(더샵아이파크) 111동 1102호
윤혁준
인천광역시 서구 크리스탈로74번길 7, 703호

명 세 서

청구범위

청구항 1

이미노디프로피오니트릴(IDPN, 3,3'- Iminodipropionitrile) 생분해용 파라코커스 코뮤니스(*Paracoccus communis*) NK1007 균주(수탁번호: KCTC 18866P).

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 균주는 서열번호 1의 16S rRNA 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 파라코커스 코뮤니스(*Paracoccus communis*) NK1007 균주(수탁번호: KCTC 18866P).

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 균주는 탄소원으로 이미노디프로피오니트릴 이외에 기타 탄소원들이 배제된 최소영양 배지에서 생장 가능한 것을 특징으로 하는 파라코커스 코뮤니스(*Paracoccus communis*) NK1007 균주(수탁번호: KCTC 18866P).

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 균주는 100,000mg/L의 초고농도 이미노디프로피오니트릴 배지 조건에서 생장이 가능한 것을 특징으로 하는 파라코커스 코뮤니스(*Paracoccus communis*) NK1007 균주(수탁번호: KCTC 18866P).

청구항 5

제1항의 이미노디프로피오니트릴 생분해용 파라코커스 코뮤니스(*Paracoccus communis*) NK1007 균주(수탁번호: KCTC 18866P) 또는 그 배양액을 포함하는 이미노디프로피오니트릴 생분해용 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 파라코커스 코뮤니스(*Paracoccus communis*) NK1007 균주(수탁번호: KCTC 18866P)는 BCM 660 배지 또는 TSB(Tryptic Soy Broth) 배지에서 배양된 것을 특징으로 하는 이미노디프로피오니트릴 생분해용 조성물.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 조성물은 이미노디프로피오니트릴로 오염된 오폐수의 정화에 사용되는 것을 특징으로 하는 이미노디프로피오니트릴 생분해용 조성물.

청구항 8

이미노디프로피오니트릴로 오염된 오폐수에 제5항 내지 제7항으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 조성물을 처리하여 오폐수의 이미노디프로피오니트릴(3,3'- Iminodipropionitrile) 독성을 경감 또는 제거하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 이미노디프로피오니트릴 분해 활성을 갖는 파라코커스 속 균주, 이를 포함하는 이미노디프로피오니트릴 생분해용 조성물, 및 이를 이용한 오폐수의 이미노디프로피오니트릴의 독성 제거 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 과학기술 문명이 발달하면서 인류의 생활 수준과 편리함이 개선되고 과거보다 개선된 현재의 생활 수준을 유지할 수 있게 되었으나, 그 반대급부로 생태환경이 오염되고, 많은 생명체들의 생존이 위협받게 되었다. 특히, 수질오염은 대기, 토양의 오염과 더불어 인간의 생존에 중요한 위협을 가하는 가장 중요한 문제이다.

[0004] 따라서, 환경단체, 정부뿐만 아니라 일반 기업체들 사이에서도 가급적 환경에 피해를 주지 않는 방향으로 공정 기술을 개발하고, 제품을 생산하고자 노력하고 있으며, 화학산업에 속하는 대부분의 기업체들에서도 수질오염이 발생하지 않고 오폐수를 정화할 수 있는 방법에 대해 많은 관심을 갖고 관련 기술을 개발하고 있다.

[0005] 미생물을 이용한 폐수처리 방식과 관련하여, 생물정화 (bioremediation), 현장 생물정화 (in situ biorestoration), 생물증대 (bioaugmentation), 생물촉진 (biostimulation) 등으로 구분되며, 이 중 생물증대는 분해미생물을 접종하여 환경오염 물질의 처리 효율을 증대하는 기술이다.

[0006] 오폐수 처리에서 생물증대 방식의 적용은 자연계에 분포하는 선택분리균주를 사용하여 미생물 제제를 제조하고, 이를 이용하여 오폐수에 존재하는 환경오염 물질에 대한 생분해력을 유지 또는 증가하는 방식으로 이루어진다. 생물증대 방식은 i) BOD 제거 효율 증가, ii) 오폐수 슬러지 부피 감소, iii) 탄화수소 폐기물의 생물처리, 및 iv) 유기 폐기물의 생물처리 등의 목적으로 현장에서 적용되고 있으며, 종래 화학 공장에서 발생하는 페놀 화합물이나 시안 화합물의 생분해에 적용된 사례나 제지공장에서 백색 부휴균을 이용하여 방류수 내에 존재하는 갈색 리그닌 화합물을 제거한 사례가 있다.

[0007] 한편, 이미노디프로피오니트릴($C_6H_9N_3$, 3,3'-Iminobispropanenitrile, CAS No. 111-94-4)은 분자량 123.1558을 갖는 점성의 투명한 액체 상태의 화합물이다. 동 화합물은 살충제 또는 염료의 용매 등 다양한 화학제품을 제조하는데 사용되는 원료 물질 또는 화학제품의 제조시 발생되는 물질이다. 동 화합물은 강력한 산화제로 작용하며, 경구로 흡입하면 유독하고, 피부 자극 및 심한 눈 손상을 일으키는 자극성 물질이고, 호흡기계에도 자극 및 손상을 일으키는 유독성 물질이다. 따라서, 이미노디프로피오니트릴을 원료로 사용하는 경우 이를 오폐수에서 분리 및 제거하여 배출하지 않고 하수로 방출하게 되면 생태계에 심각한 오염을 야기하게 된다. 그러나, 화학공장들이 밀집되어 있는 산업단지에서 물리화학적 방법을 적용하여 이미노디프로피오니트릴을 제거하기 위한 물리화학적 방법의 적용은 복잡한 설비 공정이 필요하고 이를 운전하기 위한 고가의 비용이 소요되는 등의 문제점이 있다.

[0008] 따라서, 생태계를 파괴하는 이미노디프로피오니트릴 화합물의 제거에 필요한 미생물을 발굴하여 이를 생물학적 정화 방식에 적용할 필요가 있으며, 이에 대한 산업계의 시급한 수요가 있는 실정이나, 아직까지 이미노디프로피오니트릴을 생분해하는 활성을 갖는 미생물에 대한 연구는 전무한 실정이다.

[0009] 이에, 본 발명자들은 상기 종래기술들의 문제점들을 극복하기 위하여 예의 연구노력한 결과, 여수산단의 오폐수에서 동정한 파라코커스 코뮤니스(Paracoccus communis) NK1007 균주가 100,000mg/L의 초고농도 이미노디프로피오니트릴 배지 조건에서도 생장하면서 이미노디프로피오니트릴로 오염된 오폐수의 독성을 경감 또는 제거시키는데 유용하게 활용할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

선행기술문헌

특허문헌

[0011] (특허문헌 0001) 중국특허 공개 제110255717호, Degrading bacteria of methoxy acrylate type bactericide and application of same

(특허문헌 0002) 한국특허 공개 제10-2002-0092860호, 오, 폐수 정화처리용 미생물 접촉 여재의 제조장치 및 그 제품

(특허문헌 0003) 한국특허 등록 제10-0511769호, 염화비페닐 화합물을 분해하는 미생물인 스핑고비움속 균주 및 이를 이용한 환경정화 방법

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 따라서, 본 발명의 주된 목적은 이미노디프로피오니트릴(IDPN, 3,3' - Iminodipropionitrile) 생분해용 파라코커스 코뮤니스(*Paracoccus communis*) NK1007 균주를 제공하는 데 있다.

[0013] 본 발명의 다른 목적은 이미노디프로피오니트릴 생분해용 파라코커스 코뮤니스(*Paracoccus communis*) NK1007 균주(수탁번호: KCTC 18866P) 또는 그 배양액을 포함하는 이미노디프로피오니트릴 생분해용 조성물과 이를 이용한 오폐수의 IDPN(3,3' - Iminodipropionitrile) 독성을 경감 또는 제거하는 방법을 제공하는데 있다.

[0014] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0016] 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 이미노디프로피오니트릴(IDPN, 3,3'-Iminodipropionitrile) 생분해용 파라코커스 코뮤니스(*Paracoccus communis*) NK1007 균주(수탁번호: KCTC 18866P)를 제공한다.

[0017] 본 발명자들은 이미노디프로피오니트릴로 오염된 산업단지 인근의 오폐수를 정화하는 방법을 개발하기 위하여 다양한 연구를 수행하던 중, 초고농도의 이미노디프로피오니트릴로 오염된 실제 폐수에서 성장할 수 있으면서도 독립탄소원으로 이미노디프로피오니트릴을 대사하여 오폐수에 존재하는 이미노디프로피오니트릴 화합물을 제거할 수 있는 미생물에 주목하였다. 상기 미생물은 이미노디프로피오니트릴 오염된 오폐수에서 성장 및 증식하면서 이미노디프로피오니트릴을 제거할 수 있어 경제적으로 이미노디프로피오니트릴로 오염된 오폐수를 정화할 수 있는 바, 이에 적합한 미생물을 발굴하고자 하였다.

[0018] 이를 위하여, 본 발명자들은 이미노디프로피오니트릴로 오염된 오폐수로부터 시료를 채취하여 농화배양하는 과정을 거쳐 총 84개의 독립적인 콜로니(colony)를 확보하였고, 후보 균주들을 초고농도의 이미노디프로피오니트릴 화합물을 첨가한 배지에 배양하여, 균주의 생존 여부 및 이미노디프로피오니트릴 화합물을 분해하는 효율을 측정하였고, 분해 효율이 뛰어난 균주를 분리 동정하였다. 또한, 이러한 이미노디프로피오니트릴 화합물을 생분해하는 활성을 나타내는 균주가 종래에 알려진 균주인지를 확인하기 위하여, 상기 균주로부터 수득한 16S RNA의 서열을 분석하고, 상기 균주의 생육특성을 분석한 결과, BCM 660 배지 또는 TSB(Tryptic Soy Broth) 배지에서 배양할 경우, 성장률 및 이미노디프로피오니트릴 화합물을 생분해하는 활성을 현저하게 증가시킬 수 있음을 확인하였다.

[0019] 이에, 본 발명자들은 상기 균주를 파라코커스 코뮤니스(*Paracoccus communis*) NK1007 균주로 명명하고, 이를 2020년 11월 12일자로 한국생명공학연구원 생물자원센터에 기탁하여 수탁번호 KCTC 18866P를 부여받았다.

[0020] 본 발명 파라코커스 코뮤니스(*Paracoccus communis*) NK1007 균주(수탁번호: KCTC 18866P)는 서열번호 1의 16S rRNA 서열을 갖는다.

[0021] 하기 본 발명의 일 실시예에서 입증되는 바와 같이, 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명의 파라코커스 코뮤니스(*Paracoccus communis*) NK1007 균주(수탁번호: KCTC 18866P)는 탄소원으로 이미노디프로피오니트릴 이외에 기타 탄소원들이 배제된 최소영양 배지에서 생장 가능하다.

[0022] 또한, 본 발명의 상기 파라코커스 코뮤니스(*Paracoccus communis*) NK1007 균주(수탁번호: KCTC 18866P)는 100,000mg/L의 초고농도 이미노디프로피오니트릴 배지 조건에서 생장이 가능한 것을 특징으로 한다.

[0023] 본 발명의 실시예에서는 상기 파라코커스 코뮤니스(*Paracoccus communis*) 균자가 3일 이내에서 고농도 IDPN 화합물이 포함된 M9 배지 상에서 성장 가능한 것을 관찰하였으며(도 2 참조), 특히 초고농도(100,000mg/L)의 배지 조건에서도 7일 이내에서 성장 저해를 받지 않고 배양체의 탁도가 증가하는 현상을 관찰한 바 있다.

[0024] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 이미노디프로피오니트릴 생분해용 파라코커스 코뮤니스(*Paracoccus communis*) NK1007 균주(수탁번호: KCTC 18866P) 또는 그 배양액을 포함하는 이미노디프로피오니트릴 생분해용 조성물을 제공한다.

[0025] 본 발명의 파라코커스 코뮤니스(*Paracoccus communis*) NK1007 균주(수탁번호: KCTC 18866P)는 우수한 이미노디프로피오니트릴 생분해 활성을 갖는 것을 특징으로 하는데, 본 발명의 바람직한 실시예에서는 각각 80,000mg/L

및 15,000mg/L IDPN 화합물 농도 조건에서 배양된 본 파라코커스 코뮤니스(*Paracoccus communis*) NK1007 균주 배양체를 1/50의 비율로 희석하여 M9 배지(100mg/L IDPN 화합물 첨가)에 접종하고 9일 동안 배양한 결과, 각각 88.35% 및 87.83%의 IDPN 화합물이 분해되었음을 확인할 수 있었다(도 4 참조). 또한, 파라코커스 코뮤니스(Paracoccus communis) NK1007 균주의 최종 제한 개체 수는 투입된 IDPN 화합물의 농도에 의존하여 증가하는 것을 확인하였다. 그리고, 본 발명의 파라코커스 코뮤니스(*Paracoccus communis*) NK1007 균주가 1,000mg/L의 IDPN 화합물 농도에서 최적의 생분해 활성도를 보이며, 9일의 배양 기간 동안 최대 80,000mg/L 농도의 IDPN 화합물을 약 88% 정도로 제거할 수 있는 것으로 측정되었다. 따라서, 라텍스 생산 등 화학물질 생산 처리 시설 등에서 다량 발생되는 폐수 내 IDPN 화합물의 농도가 실제 1,200mg/L 정도인 것을 감안하면, 본 발명의 파라코커스 코뮤니스(Paracoccus communis) NK1007 균주는 IDPN 화합물을 생물학적으로 완전하게 처리 가능한, 최적의 미생물 자원인 것으로 사료된다.

[0026] 본 발명의 상기 이미노디프로피오니트릴 생분해용 조성물은 파라코커스 코뮤니스(*Paracoccus communis*) NK1007 균주(수탁번호: KCTC 18866P)는 BCM 660 배지 또는 TSB(Tryptic Soy Broth) 배지에서 배양될 수 있다. 본 발명자들은 생물증대(bioaugmentation) 공법 적용을 위해, 실제 하수처리시설에 본 발명의 균주를 적용할수 있도록 파라코커스 코뮤니스(*Paracoccus communis*) NK1007 균주의 바이오매스(biomass)를 확보하고자 대량 배양 배지를 연구하였다. 이를 위해 본 발명의 파라코커스 코뮤니스(*Paracoccus communis*) NK1007 균주의 확보 가능 개체수 및 경제성을 고려하여 BCM660 배지 및 TSB(Tryptic Soy Broth) 배지를 선정하였으며, 배지 농도에 따른 세균 배양율을 최적화하기 위한 배지 농도별 총 산소 소비율(AOU) 측정 값에 따라 균주 증식율을 평가하였다. 그 결과, 상기 BCM 660 배지 또는 TSB(Tryptic Soy Broth) 배지의 2종 배지에서 모두에서 짧은 유도기(lag-time)가 관찰되었으며, 상대적으로 높은 산소 소비율이 관찰되었다. 또한, BCM 660 배지를 이용하여 배양하는 경우 $2X10^{9}$ 수준의 세포 증식이 관찰되었고, TSB(Tryptic Soy Broth) 배지에서는 $6X10^{8}$ 수준의 세포 증식이 관찰되어, 이들 2종 배지 모두 파라코커스 코뮤니스(*Paracoccus communis*) NK1007 균주의 바이오매스(biomass) 확보에 사용할 수 있음을 확인하였다.

[0027] 본 발명의 상기 이미노디프로피오니트릴 생분해용 조성물은 오염된 오폐수의 정화에 사용될 수 있다. 이를 확인하기 위하여 본 발명자들은 실제 폐수 환경을 구현하여 생물증대(bioaugmentation) 공법에 기반한 공정 운전 연구를 수행하였고, 본 발명의 파라코커스 코뮤니스(*Paracoccus communis*) NK1007 균주 배양체가 접종될 경우, 총 유기탄소(TOC) 감소에 대한 유도기(lag-time)을 1일 가량 감소시킬 수 있으며, 최종 유기탄소(TOC) 농도 역시 무처리 음성 대조군에 비해 유의적으로 낮게 유지할 수 있는 것을 확인한 바 있다. 또한, 활성슬러지 내 IDPN 화합물에 대한 분해 활성 실험에서도 본 균주 투입 유무에 따라 1일 배양 과정에서 약 100ppm 정도의 IDPN 화합물에 대한 감소량 차이를 확인한 바 있다. 이러한 실험 결과를 통해, 파라코커스 코뮤니스(*Paracoccus communis*) NK1007 균주를 이용한 생물증대 공정을 실제 공장의 하수처리 공정 또는 시설에 적용할 경우, IDPN 화합물의 분해 효율을 실질적으로 향상시킬 수 있는 것으로 분석된다.

[0028] 본 발명이 다른 양태에 따르면, 본 발명은 이미노디프로피오니트릴로 오염된 오폐수에 파라코커스 코뮤니스(*Paracoccus communis*) NK1007 균주를 포함하는 상기 이미노디프로피오니트릴 생분해용 조성물을 처리하여 오폐수의 이미노디프로피오니트릴(3,3’- Iminodipropionitrile) 독성을 경감 또는 제거하는 방법을 제공한다. 전술한 바와 같이 본 발명의 상기 이미노디프로피오니트릴 생분해용 조성물은 초고농도의 이미노디프로피오니트릴 함유 오폐수에서 생존 가능하며, 이미노디프로피오니트릴 화합물의 생분해에 우수한 활성을 나타내므로 오폐수의 이미노디프로피오니트릴(3,3’- Iminodipropionitrile) 독성을 경감 또는 제거하고, 오염된 오폐수의 정화에 사용될 수 있다. 상기 파라코커스 코뮤니스(*Paracoccus communis*) NK1007 균주, 이의 배양 배지 특성, 및 이미노디프로피오니트릴 생분해 특성은 앞에서 상세히 설명한바, 명세서가 지나치게 복잡하게 되는 것을 피하기 위해 여기서는 생략하도록 한다.

발명의 효과

[0030] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0031] (a) 본 발명은 이미노디프로피오니트릴 분해 활성을 갖는 파라코커스 코뮤니스(*Paracoccus communis*) NK1007 균주 및 이을 포함하는 이미노디프로피오니트릴 생분해용 조성물을 제공한다.

[0032] (b) 본 발명의 파라코커스 코뮤니스(*Paracoccus communis*) NK1007 균주는 100,000mg/L의 초고농도 이미노디프

로피오니트릴을 함유한 오폐수 환경에서서도 지속적으로 자가 증식이 가능하며, 이미노디프로피오니트릴을 생분해 하는 활성이 우수하여 이미노디프로피오니트릴 오염 오폐수의 독성을 경감 또는 제거시키는데 유용하게 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0034] 도 1은 오폐수에서 분리되어 3차 농화 배양된 배양체들을 고체배지 상에 접종하여 생성된 후보 균주들의 콜로니 사진 샘플이다.

도 2는 본 발명의 파라코커스 코뮤니스(*Paracoccus communis*) NK1007 균주에 대한 계통수를 도시한 그림이다.

도 3은 100ml M9 액체배지 상에 100mg/L의 농도로 IDPN 화합물을 첨가한 배지에 본 발명의 파라코커스 코뮤니스(*Paracoccus communis*) 균주를 접종한 후, 1일, 2일, 및 3일 경과 후에 생장 양태를 관찰하고 촬영한 사진이다.

도 4는 본 발명의 파라코커스 코뮤니스(*Paracoccus communis*) NK1007 균주의 IDPN 화합물의 생분해 활성을 평가한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 5는 IDPN 농도 변화에 따른 본 발명의 파라코커스 코뮤니스(*Paracoccus communis*) NK1007 균주의 생장곡선을 측정하여 나타낸 그래프이다.

도 6은 IDPN 농도 변화에 따른 본 발명의 파라코커스 코뮤니스(*Paracoccus communis*) NK1007 균주의 생분해 활성을 비교 분석한 그래프이다.

도 7은 IDPN 농도 변화에 따른 배양 과정에서 관찰된 OD 값 및 IDPN 화합물 농도를 기반으로 하여 세포 당 최대 IDPN 화합물의 분해율을 시뮬레이션하여 나타낸 그래프이다.

도 8은 IDPN 화합물이 첨가된 M9 배지(M9 + IDPN 2000ppm)에 본 발명의 파라코커스 코뮤니스(*Paracoccus communis*) NK1007 균주를 접종하고 생장율을 측정하여 나타낸 그래프이다.

도 9는 IDPN 화합물이 첨가된 M9 배지(M9 + IDPN 2000ppm)에 본 발명의 파라코커스 코뮤니스(*Paracoccus communis*) NK1007 균주를 반연속식으로 2회 접종하고 생장율을 측정하여 나타낸 그래프이다.

도 10은 BCM 660 배지(Glucose + Yeast Extract 조합 배지) 및 TSB(Tryptic Soy Broth) 배지에서 본 발명의 파라코커스 코뮤니스(*Paracoccus communis*) NK1007 균주를 접종하고 총 산소 소비량(Accumulated Oxygen Uptake)을 측정하여 나타낸 그래프이다.

도 11은 BCM 660 배지 농도 변화에 따른 본 발명의 파라코커스 코뮤니스(*Paracoccus communis*) NK1007 균주의 총 산소 소비량(Accumulated Oxygen Uptake)을 측정하여 나타낸 그래프이다.

도 12는 파라코커스 코뮤니스(*Paracoccus communis*) NK1007 균주의 배양체를 오폐수 시료에 접종하여 배양한 후, 외관 특성을 관찰한 사진이다.

도 13은 파라코커스 코뮤니스(*Paracoccus communis*) NK1007 균주를 오폐수 시료에 접종하여 배양한 후, 총 유기탄소(TOC) 값의 변화를 측정하여 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[0037] **실시예 1. 후보 균주의 분리 동정**

[0038] 1-1. 시료 채취

[0039] 본 발명에서 분해하고자 하는 화합물인 이미노디프로피오니트릴(IDPN, 3,3' - Iminodipropionitrile, 이하 IDPN이라고 함)은 신경계 독성물질이다. 따라서, 본 발명자들은 우선적으로 IDPN 화합물이 다량 함유된 조건에서도 생존하고, 이를 분해할 수 있는 세균을 찾고자 여수 산단의 폐수를 채수하여 후보 균주들을 분리하였다.

[0040] 시료는 원수를 포함하여 각 1L씩 채수하였으며, 채수 즉시 시료의 변질을 최대한 방지하고자 ICE box에 보관하

여 실험실로 운반하였다. 실험실에 도착 후 50ml씩 분취하여 4℃에서 냉장 보관하였다. DNA 추출용 시료는 원심분리기를 이용하여 펠렛 다운(pellet down) 한 후, -20℃ 냉동고에 보관하였다.

[0042] 1-2. 미생물 농화배양

[0043] 타겟으로 하는 신경계 독성물질 IDPN의 생분해 가능 미생물을 분리 동정하고자, 상기 여수산단 내 폐수에서 채수한 시료들로부터 채취한 후보 미생물들을 농화배양 방법을 통해 배양을 수행하였다.

[0044] 본 발명에서는 신경계 독성물질 IDPN이 분리 동정하고자 하는 미생물의 순수한 기질이 되도록, 기타 탄소원들을 배제된 최소영양 배지, M9 배지를 기반으로 농화배양용 액체배지를 제작하였다. M9 최소영양 배지의 조성은 [표 1]과 같다.

[0045] [표 1]

[0046]

100 ml M9 salt solution (10X)	100 ml
Na_2HPO_4	33.7 mM
KH_2PO_4	22 mM
NaCl	8.55 mM
NH_4Cl	9.35 mM
20% Glucose	0.4 %
$MgSO_4$	1 mM
$CaCl_2$	0.3 mM
Biotin	1 ㎍
Thiamin	1 ㎍
Trace elements	1X

[0048] 농화배양용 배지 제작 과정에서, IDPN 화합물은 친수성 물질로, 용해도가 높아 액체배지 상에 잘 용해되는 것으로 관찰되었다. 제작된 M9 액체배지 5ml에 독성물질인 IDPN 화합물을 각각 1,000mg/L 및 100mg/L가 되도록 첨가하였다. 채취된 시료들을 1/50(40ul)로 희석 접종하여, 7일간 30℃ 배양기에서 배양한 후, 새로운 배지에 농화배양체 일부(1/50 농도)를 접종하여 새롭게 농화배양하였다. 이 과정을 3회 반복 수행한 후, 고체배지에 접종하여 농화배양 된 미생물을 콜로니(colony) 별로 분리 선별하였다.

[0049] 농화배양체의 성장 유무는 배양 과정에서 관찰된 탁도를 기준으로 판단하였으며, 각 시료의 농화배양체 중 탁도가 증가된 시험 조건을 선별하여 새로운 배지에 재배양하는 과정을 수행하였다.

[0051] 1-3. 미생물 분리 및 동정

[0052] 고체배지는 M9 액체배지에 20%의 한천을 포함하여 제작하였으며, 고압증기멸균 후, 60℃의 온도로 식히는 과정에서, 신경계 독성물질인 IDPN 화합물을 1000mg/L의 농도로 첨가하여 제작하였다. 제작된 고체배지 상에, 3차 농화 배양된 배양체를 1×10^6 CFU/ml 농도로 희석하여 고체배지 상에 접종하였으며, 30℃ 배양기에서 7일간의 배양 과정을 통해 콜로니(colony) 형성을 확인하였다.

[0053] 이후, 우드 스틱(wood stick)을 이용하여 각각의 콜로니(colony)를 분리하고, 새로운 고체배지에 접종하였으며, 동일한 배양 과정을 통해 총 84개의 독립적인 콜로니(colony)들을 선별하였다(도 1 참조).

[0054] 선별된 미생물은 16S rRNA 유전자의 동정 과정을 수행하였다.

[0055] 균주 동정은 계통수를 분석하기 위해 분리된 미생물의 DNA를 상용화 키트 등을 이용하여 추출하였고, 추출된

DNA는 bacterial 16S rRNA 유전자를 특이적으로 증폭할 수 있는 27F-1492R 프라이머를 이용하여 PCR 반응을 수행하였다. 증폭된 PCR 산물은 정제 키트(purification kit)를 통하여 프라이머 다이머(primer dimer) 등을 제거하였고, 유전자 서열을 확보하였다.

[0056] 확보된 서열은 EzTaxon 프로그램을 이용하여 글로벌 얼라인먼트(global alignment) 분석법을 이용하여 현재까지 분리된 가장 가까운 균주를 확인하였고, 근접한 서열들을 모아 계통수를 작성하였다(도 2).

[0057] 계통수를 작성할 때, MEGA6 프로그램에서 제공되는 네이버-조인닝(neighbor-joining)을 기본으로 하여, 필요한 경우에는 최소-진화(minimum-evolution) 및 최대-유사 알고리즘(maximum-likelihood algorithms)을 이용하였다.

[0058] 추가적으로 본원발명의 최종 목적인 IDPN 화합물로 오염된 오폐수에 대한 생물증대(bioaugmentation) 기법 적용이 가능한 균주를 선별하기 위하여 액체배지 상에서 성장이 빠른 균주를 선별하였고, 대표 균주를 이용한 IDPN 화합물의 독립적인 생분해능 측정 실험을 수행하였다.

[0059] 독립 개체의 배양 과정에서, 하기 [표 2]의 파라코커스 코뮤니스(*Paracoccus communis*)로 명명된 배양체는 3일 이내에서 고농도 IDPN 화합물이 포함된 M9 배지 상에서 성장이 가능한 것으로 관찰되었으며, 특히 초고농도(100,000mg/L)의 배지 조건에서도 7일 이내에서 성장 저해를 받지 않고 배양체의 탁도가 증가하는 현상이 관찰되었다.

[0060] [표 2]

Group	Genus	Species	Isolate Number
3	*Paracoccus*	*communis*	NK1007

[0061]

[0062] 이러한 실험 결과를 통해, 신경독성물질인 IDPN 화합물을 생분해하는 균주로 파라코커스 코뮤니스(*Paracoccus communis*) NK1007 균주를 선발하였고, 이하 동 균주에 대한 IDPN 화합물의 생분해 특성연구를 수행하였다.

[0064] **실시예 2. 파라코커스 코뮤니스 균주의 IDPN 화합물에 대한 생분해 특성 분석**

[0065] Humas 사의 CODcr kit를 이용하여 신경계 독성물질인 IDPN 화합물이 포함된 M9+ 배지 내의 IDPN 농도를 측정하였다. 2ml의 시료(IDPN이 포함된 M9 액체배지)를 0.22um 시린지 필터(syringe filter)를 이용하여 정제한 후, COD Kit에서 제공된 바이알(vial)에 첨가하여 150℃에서 2시간 동안 가열하였다. 이후 상온에서 바이알(vial)을 식힌 후, 제조사에서 제공하는 분광광도계를 이용하여 시료 내 IDPN 화합물의 농도를 측정하였다.

[0066] 프리테스트(pretest) 결과 M9 배지는 일체의 탄소(carbon) 성분을 포함하고 있지 않았으며, “M9 + IDPN” 배지에서 측정된 CODcr 농도를 기준값으로 하여 생분해 특성 분석을 수행하였다.

[0067] 상기 실시예 1-3에서 분리 동정된 본 발명의 파라코커스 코뮤니스(*Paracoccus communis*) 균주 NK1007을 대상으로 IDPN 화합물 분해 특성을 산출하기 위한 생장 특성 관찰을 수행하였다.

[0068] 이를 위해 100ml M9 액체배지 상에 100mg/L의 농도로 IDPN 화합물을 첨가하였다. 이후, 선 배양된 본 발명의 파라코커스 코뮤니스(*Paracoccus communis*) 균주 NK1007의 배양체를 1/50의 비율로 희석하여 접종하였고, 30℃ 교반 배양기에서 교반 배양하면서, 매 24시간 간격으로 시료 3ml를 채취하였다.

[0069] 실험 결과, 본 발명의 파라코커스 코뮤니스(*Paracoccus communis*) 균주는 접종 후 약 3일간 정체기를 보였으며, 접종 4일부터 탁도가 증가하는 것으로 관찰되었다(도 3 참조). 따라서, 접종 9일까지 충분한 기간의 균주 증식을 통해 생분해 활성을 극대화하였으며, 이후 상등액을 0.22um 시린지 필터(syringe filter)를 이용하여 정제한 후, COD 측정 실험에 사용하였다. 100mg/L 농도로 IDPN 화합물을 접종한 “M9+IDPN” 배지 상에서 COD 값으로 측정한 IDPN 화합물은 약 85,000mg/L의 농도가 측정되었다.

[0070] 파라코커스 코뮤니스(*Paracoccus communis*) 균주 NK1007은 높은 IDPN 화합물 농도에서도 성장이 가능하기 때문에, 약 80,000mg/L IDPN 화합물 농도 조건에서 배양된 파라코커스 코뮤니스(*Paracoccus communis*) NK1007 균주의 배양액을 기반으로 COD 값을 측정하여 동 균주의 IDPN 화합물의 생분해 활성을 평가하였다. 또한, 약 15,000mg/L IDPN 화합물 농도 조건에서 배양된 파라코커스 코뮤니스(*Paracoccus communis*) 균주 NK1007의 배양체을 기반으로 동일 측정기법을 적용하여 동 균주의 IDPN 화합물의 생분해 활성을 평가하였다.

[0071] 실험 결과, 도 4를 참조하면, 초고농도의 IDPN 조건에서도 파라코커스 코뮤니스(Paracoccus communis)NK1007 균주는 9일의 배양 기간 동안 약 88%의 IDPN 화합물에 대한 분해능을 보이는 것으로 관찰되었다. 구체적으로 100ml의 M9 액체배지 상에 100mg/L의 농도로 IDPN 화합물을 첨가하여 제조한 M9I-100 배지의 COD 측정값은 85,000ppm으로 측정되었고, 100ml의 M9 액체배지 상에 10mg/L의 농도로 IDPN 화합물을 첨가하여 제조한 M9I-10 배지의 COD 측정값은 8,500ppm으로 측정되었다.

[0072] 따라서, 상기 M9I-100 배지의 COD 측정값과 M9I-10 배지의 COD 측정값을 바탕으로, 80,000mg/L IDPN 화합물 농도 조건에서 배양되었던 본 발명의 균주 배양체를 1/50의 배율로 희석하여 상기 M9I-100 배지에 접종하고 9일 동안 배양한 실험군(도 4 왼쪽)의 COD 측정값을 통해 대략 88.35%의 IDPN 화합물이 분해되었음을 확인할 수 있었고, 마찬가지로 15,000mg/L IDPN 화합물 농도 조건에서 배양되었던 본 발명의 균주 배양체를 상기 M9I-100 배지에 접종하여 9일 동안 배양한 실험군(도 4 오른쪽)의 COD 측정값을 통해 대략 87.83%의 IDPN 화합물이 분해되었음을 확인할 수 있었다.

[0073] 이러한 실험 결과를 바탕으로 본 발명의 파라코커스 코뮤니스(*Paracoccus communis*) 균주 NK1007은 IDPN 화합물 분해에 우수한 활성이 있는 것을 확인할 수 있었다.

[0075] **실시예 3. 미생물 성장 동력학 계수(kinetic parameter)에 따른 생분해 특성 분석**

[0076] 본 발명의 파라코커스 코뮤니스(*Paracoccus communis*) 균주 NK1007을 대상으로 IDPN 화합물 분해 특성 및 생분해능과 관련된 미생물 성장 동력학 계수(kinetic parameter)를 산출하기 위한 생장 특성 관찰 연구를 아래와 같이 수행하였다.

[0077] 먼저, 100ml의 M9 액체배지 상에 각각 0, 100, 500, 1,000, 3,000, 및 6,000mg/L의 농도로 IDPN 화합물을 첨가하였다. 이후, 선 배양된 파라코커스 코뮤니스(*Paracoccus communis*) NK1007 균주의 배양체를 1/50의 비율로 접종하였으며, 30℃ 교반 배양기에서 교반 배양하면서, 매 24시간 마다 3ml의 시료를 채취하였다. 채취된 시료로부터 1ml를 분취하여 OD 값을 측정하였으며, 2ml의 시료를 0.22um 시린지 필터(syringe filter)를 이용하여 여과한 후, SHIMADZU 사의 TOC 측정 장비를 이용하여 총 유기탄소(TOC, total organic carbon) 값을 측정하였다.

[0078] 총 120 시간의 배양 과정에서 관찰된 성장곡선을 [도 5]에 정리하였다. [도 5]를 참조하면, IDPN 화합물이 투입되지 않은 음성대조군(IDPN 0mg/L)에서는 초기 균주의 농도가 배양 종료 시까지 유지되면서 파라코커스 코뮤니스(*Paracoccus communis*) NK1007 균주의 성장이 관찰되지 않았다. 반면, IDPN 화합물이 투입된 조건 하에서 파라코커스 코뮤니스(*Paracoccus communis*) NK1007 균주는 배양과정에서 약 3일간의 성장 지체기를 보이는 것으로 관찰되었으나, 지체기를 지난 시점부터 약 48시간 이내에 급격한 개체수 증가를 보이는 것으로 관찰되었다.

[0079] 또한, 파라코커스 코뮤니스(*Paracoccus communis*) NK1007 균주의 최종 제한 개체 수는 투입된 IDPN 화합물의 농도에 의존하여 증가하고, 이를 최종 OD 값 증가로 확인할 수 있었다.

[0081] **실시예 4. 총 유기탄소(TOC) 분석을 통한 IDPN 화합물의 생분해 활성 정량분석**

[0082] TOC 측정 장치(Shimazu 사, 일본)를 사용하여, 농도별 배양 과정에서 24시간 간격으로 채취된 시료 내 IDPN 농도를 정량분석하여 파라코커스 코뮤니스(*Paracoccus communis*) NK1007 균주의 IDPN 화합물에 대한 생분해 활성을 측정하였다.

[0083] 장치의 측정 가능 농도 한계를 고려하여, 각각의 시료 내 IDPN 화합물 농도를 최종 20mg/L로 희석하여 분석을 수행하였다. TOC 측정장비의 전용 바이알(vial) 내에 구비된 3차 증류수를 이용하여 시료를 희석하였고, 최종 부피는 30ml로 조정하였다. TOC 측정장비 운전은 기구축된 NTOC 측정법(휘발성이 없는 물질 측정용)을 사용하여 수행되었으며, 측정이 완료된 시료의 농도 측정값은 최종 희석 배율을 적용하여 최종 농도 값으로 변환되었다.

[0084] 도 6을 참조하면, 각 IDPN 농도별 투여된 파라코커스 코뮤니스(*Paracoccus communis*) NK1007 균주의 생분해 활성을 비교 분석한 결과, 각각 100, 500, 1,000, 3,000, 및 6,000mg/L의 IDPN 농도 조건하에서, 파라코커스 코뮤니스(*Paracoccus communis*) NK1007 균주는 각각 80.9%, 86.1%, 89.8%, 49.6%, 및 37.1%의 IDPN 화합물에 대한 최종 제거율을 보였다.

[0085] 또한, 파라코커스 코뮤니스(*Paracoccus communis*) NK1007 균주의 생분해 활성 평가의 파라메터(parameter)인

세포의 최대 비증식 속도(umax(OD))와 제한기질 반포화 농도(Ks) 값은 각각 0.09과 2039.12로 측정되었다.

[0086] 이는 파라코커스 코뮤니스(*Paracoccus communis*) NK1007 균주가 최대 0.090D/hr의 속도로 성장이 가능하며, 최대 성장에 대한 반포화 농도는 약 2,039 mg/L임을 의미한다.

[0087] 또한, 배양 과정에서 관찰된 OD 값 및 IDPN 화합물 농도를 기반으로 하여 세포 당 최대 IDPN 화합물의 분해율을 평가해본 결과, 파라코커스 코뮤니스(*Paracoccus communis*) NK1007 균주의 세포 당 최대 IDPN 화합물에 대한 분해율은 IDPN 화합물 1,000mg/L 농도, 및 96 ~ 120 시간의 배양 조건에서 세포 당 최대 IDPN 분해율을 보이는 것을 관찰되었다(도 7 참조).

[0088] 이러한 실험 결과를 통해, 파라코커스 코뮤니스(*Paracoccus communis*) NK1007 균주는 1,000mg/L의 IDPN 화합물 농도에서 최적의 생분해 활성도를 보이며, 최대 80,000mg/L 농도의 IDPN 화합물을 9일의 배양 기간 동안 약 88% 정도로 제거할 수 있는 것으로 측정되었다. 또한, 라텍스 생산 등 화학물질 생산 처리 시설 등에서 다량 발생되는 폐수 내 IDPN 화합물의 농도가 실제 1,200mg/L 정도인 것을 감안하면, 본 발명의 파라코커스 코뮤니스(*Paracoccus communis*) NK1007 균주는 IDPN 화합물을 생물학적으로 완전하게 처리 가능한, 최적의 미생물 자원인 것으로 사료된다.

[0090] **실시예 5. 대량증식을 위한 배지 개발**

[0091] 생물증대(bioaugmentation) 공법 적용을 위해, 실제 하수처리시설에 적용 가능하도록 파라코커스 코뮤니스(*Paracoccus communis*) NK1007 균주의 바이오매스(biomass)를 확보하고자 미생물 대량배양장치(BCS system)를 이용하여 배양 연구를 수행하였다.

[0092] 종래 M9 기본배지 상에 IDPN을 첨가하여 제조되었던 “M9+IDPN” 배지 조건에서는 증식속도가 현저히 느리고, 하수처리시설에 적용하기 충분한 바이오매스(biomass)를 확보하기 어려우므로, 본 발명의 파라코커스 코뮤니스(*Paracoccus communis*) NK1007 균주의 대량배양을 위해 사용 가능한 배지를 개발하였다.

[0093] 또한, 선정된 배지의 적정성 평가를 위해, 배양 과정에서 관찰된 시간에 따른 총 산소 소비량 측정값을 기존에 시험하였던 IDPN 화합물이 첨가된 M9 배지(M9 + IDPN 2000ppm)에서의 측정값과 비교하였다.

[0094] 실험 결과, IDPN 화합물이 첨가된 M9 배지에서 본 발명의 파라코커스 코뮤니스(*Paracoccus communis*) NK1007 균주의 유도기(lag-time)는 대략 120시간으로 측정되었다(도 8 참조). 생물증대 공정에서 사용되는 균주의 유도기(Lag-time)가 긴 경우에 하수처리시설의 짧은 운전시간(HRT)에 의해 유용 균주의 토착이 일어나지 않으며, 유실될 우려가 있다. 따라서, 본 발명의 파라코커스 코뮤니스(*Paracoccus communis*) NK1007 균주는 IDPN 화합물을 단일 탄소원으로 분해하며 증식은 가능하나, 상대적으로 긴 유도기(lag-time)로 인해 새로운 배지 개발의 필요가 있음을 확인할 수 있었다.

[0095] 또한, 추가로 하수처리장에서 직접 적용하기에 상대적으로 긴 유도기(lag-time)를 단축하고자, IDPN 화합물이 첨가된 M9 배지(M9 + IDPN 2000ppm)에서 증식된 균주를 새롭게 IDPN 화합물이 첨가된 M9 배지(M9 + IDPN 2000ppm)에 재접종하여 2차 증식을 유도하는 방식의 반연속식 배양 연구를 수행하였으며, 이를 통해 한 결과, 유도기(lag-time)를 대략 20시간으로 줄일 수 있었으나, 아직까지 하수처리시설 현장에 적용하기에는 상대적으로 긴 유도기(lag-time)가 관찰되었다(도 9 참조).

[0096] 이를 극복하고자, M9 배지와 같은 최소 영양 배지가 아닌, 혼합배지로 바이오매스(biomass)를 과량 생산하고 이를 하수처리시설 반응조에 직접 투입하는 방법을 시도하였다. 이를 위해 BCM 660 배지(Glucose + Yeast Extract 조합 배지) 및 TSB(Tryptic Soy Broth) 배지의 2종 배지에 본 발명의 파라코커스 코뮤니스(*Paracoccus communis*) NK1007 균주를 각각 접종하여 배양시키면서, 호흡률 측정장치(EZ-Oxyro Respirometer) 및 BOD Trak II를 이용하여 시간에 따른 총 산소 소비량(Accumulated Oxygen Uptake)을 이용하여 측정하는 방법으로 시험하였다.

[0097] 실험 결과, 도 10을 참조하면, 2종 배지에서 모두 짧은 유도기(lag-time)가 관찰되었으며, 상대적으로 높은 산소 소비율이 관찰되었다. 또한, BCM 660 배지를 이용하여 배양하는 경우 $2X10^{9}$ 수준의 세포 증식이 관찰되어, $6X10^{8}$ 수준의 세포 증식이 관찰된 TSB(Tryptic Soy Broth) 배지에 비해 증식 효율이 높은 것으로 나타났다.

[0098] 최종적으로 배양 과정에서 본 발명의 파라코커스 코뮤니스(*Paracoccus communis*) NK1007 균주의 확보 가능 개체수 및 경제성을 고려하여 BCM 660 배지를 최종 선정하였으며, 배지 농도에 따른 세균 배양율을 최적화하기 위한

배지 농도별 총 산소 소비량(AOU, Accumulated Oxygen Uptake Unit) 측정값에 따라 균주 증식율을 평가하였다.

[0099] 도 11을 참조하면, BCM 660 배지의 농도에 따른 파라코커스 코뮤니스(*Paracoccus communis*) NK1007 균주의 증식 효율이 높아지는 것으로 관찰되었으나, 일정 농도 이상의 조건에서는 배지의 투입 농도에 비례하여 증식 효율이 증가하지는 않았다. 배지 투입 농도와 균주 증식율을 고려하여, 생물증대(bioaugmentation) 공정을 이용하여 하수처리시설 현장에 본 균주를 적용하기 위한 최적의 배양조건은 0.4% BCM 660 배지를 이용하여 배양하는 것이 최적인 것으로 분석되었다.

[0100] 상기와 같이 선정된 배지 조건을 기반으로 상업화된 배양기(BCS System)를 이용하여 본 균주의 대량배양을 수행한 결과, 증식된 균의 농도는 생물증대(bioaugmentation) 공법을 하수처리시설 내 반응기에 적용하기 위한 이론적인 양적 기준을 충족하는 것으로 사료된다.

[0102] **실시예 6. 하수처리시설 내 IDPN 분해 활성**

[0103] 본 발명의 파라코커스 코뮤니스(*Paracoccus communis*) NK1007 균주가 갖는 IDPN 화합물에 대한 분해 활성을 실제 하수처리시설에 적용하고자 실제 폐수 환경을 구현하여 생물증대(bioaugmentation) 공법에 기반한 공정 운전 연구를 수행하였고, 이를 통해 오폐수에 존재하는 IDPN 화합물에 대한 본 균주의 분해능을 평가하였다.

[0104] 하수처리시설의 활성슬러지 반응조로부터 수집된 시료 내 분포하는 다른 미생물들의 영향을 배제하기 위해, 0.22um 시린지 필터(syringe filter)를 이용하여 오폐수 시료를 제균하였다.

[0105] 파라코커스 코뮤니스(Paracoccus communis) NK1007 균주의 바이오매스(biomass)를 확보하기 위해, 혼합배지 상에서 O/N 배양을 수행하였으며, 배양체를 원심분리(4500rpm, 20min)한 후, 정제된 물 시료를 이용하여 3회 세척하고, 앞서 제균한 오폐수 시료에 최종 접종농도 1×10^{8} cells 수준으로 접종하였다.

[0106] 파라코커스 코뮤니스(*Paracoccus communis*) NK1007 균주가 접종된 시험군과 무처리 음성 대조군을 25℃, 200rpm 조건으로 약 10일 동안 배양하면서, 1일 간격으로 시료를 채취하였으며, 채취된 시료는 0.22um 시린지 필터로 정제하였다.

[0107] 위와 같이 확보된 정제 시료들로부터 반응액 내 IDPN 화합물의 농도 감소 변화를 관찰하고자, 총 유기탄소(TOC) 분석값을 이용하여 정량하였다.

[0108] 실험 결과, 생물증대(bioaugmentation) 과정에서, 파라코커스 코뮤니스(*Paracoccus communis*) NK1007 균주의 배양체가 접종된 배지는 일정 탁도(OD=~0.2)를 유지하였던 반면, 음성대조군에서는 탁도 변화가 관찰되지 않았다(도 12 참조).

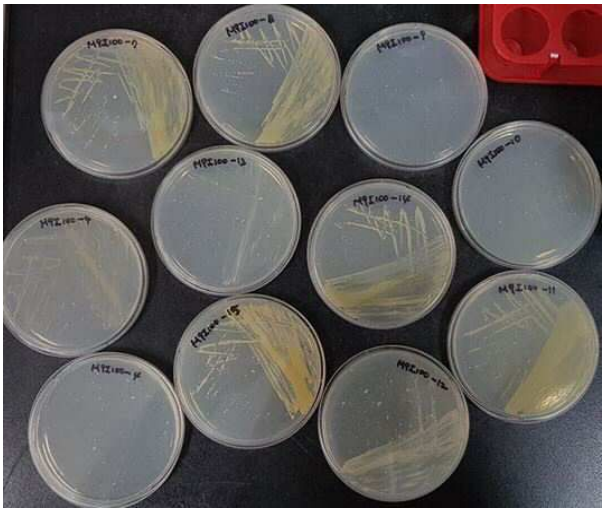
[0109] 또한, 도 13의 총 유기탄소(TOC) 분석결과를 참조하면, 제균된 오폐수에 본 발명의 파라코커스 코뮤니스(*Paracoccus communis*) NK1007 균주 배양체가 접종될 경우, 총 유기탄소(TOC) 감소에 대한 유도기(lag-time)을 1일 가량 감소시킬 수 있으며, 최종 유기탄소(TOC) 농도 역시 무처리 음성 대조군에 비해 유의적으로 낮게 유지할 수 있는 것으로 관찰되었다.

[0110] 상기와 같은 결과를 통해, 본 발명의 파라코커스 코뮤니스(*Paracoccus communis*) NK1007 균주가 실제 하수처리시설에도 적용 가능하며, 하수 내 분포하는 신경독성물질인 IDPN 화합물을 분해하는 생물증대(bioaugmentation) 공정에 유용하게 활용될 수 있음을 확인할 수 있었다.

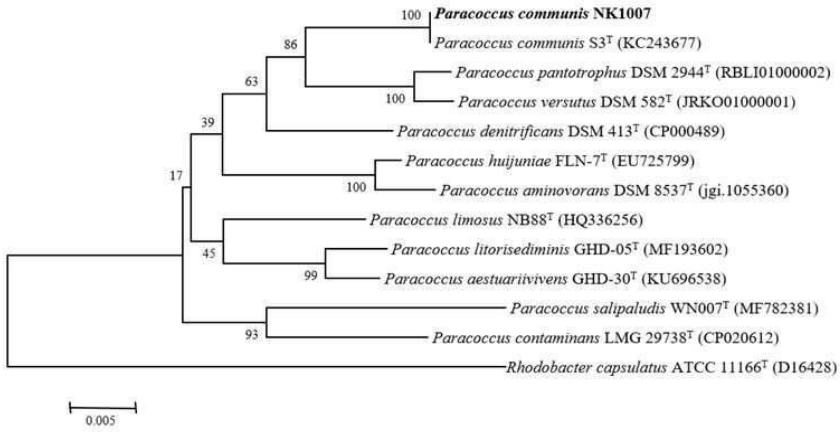
[0111] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

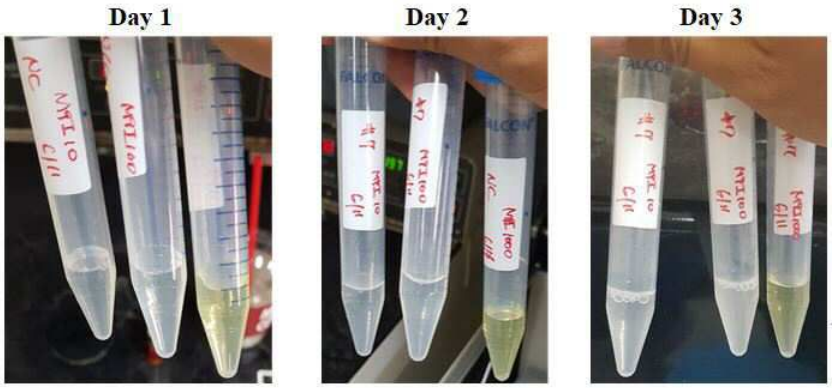
도면1



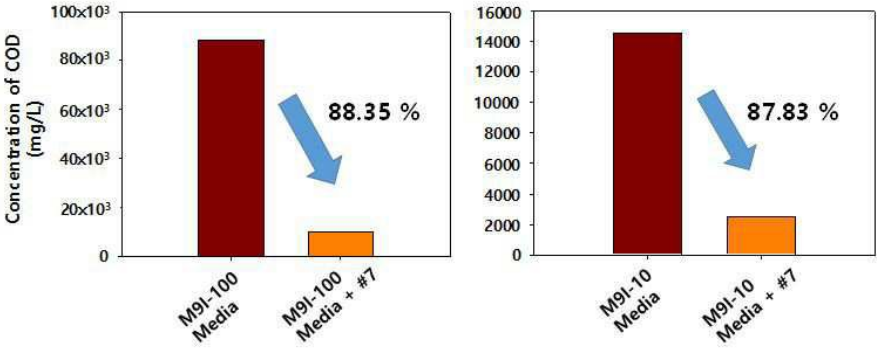
도면2



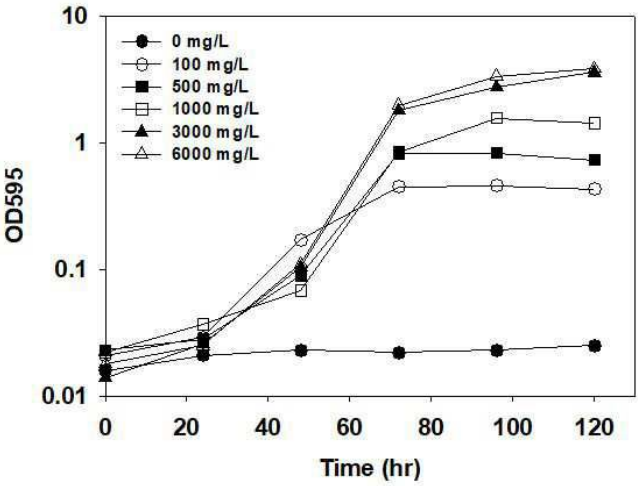
도면3



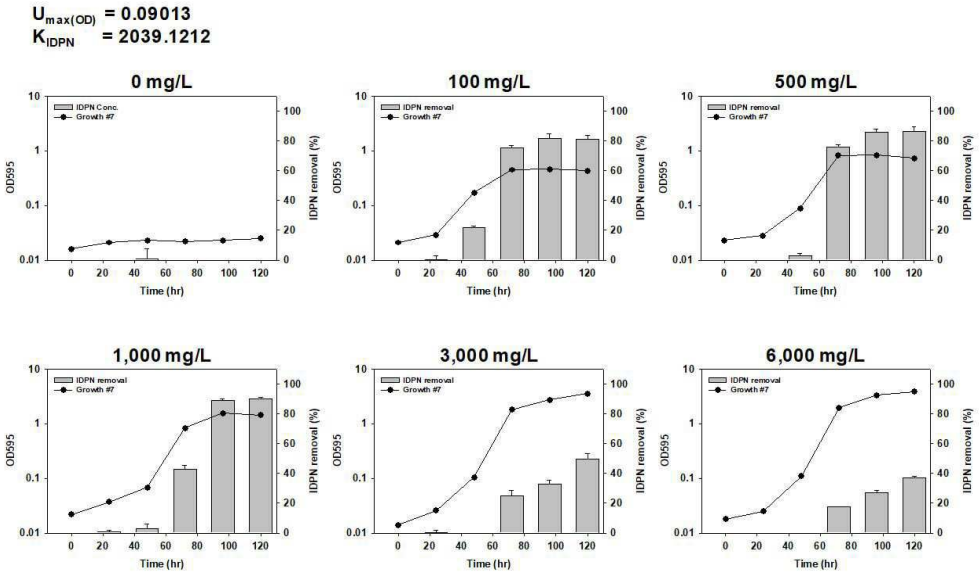
도면4


Concentration of COD (mg/L)
100x10³
80x10³
60x10³
40x10³
20x10³
0
88.35 %
M9I-100 Media
M9I-100 Media + #7
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
87.83 %
M9I-10 Media
M9I-10 Media + #7

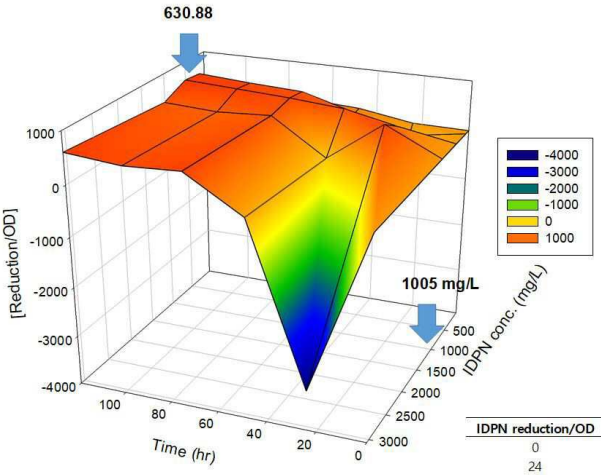
도면5


0 mg/L
100 mg/L
500 mg/L
1000 mg/L
3000 mg/L
6000 mg/L
OD595
10
1
0.1
0.01
0
20
40
60
80
100
120
Time (hr)

도면6

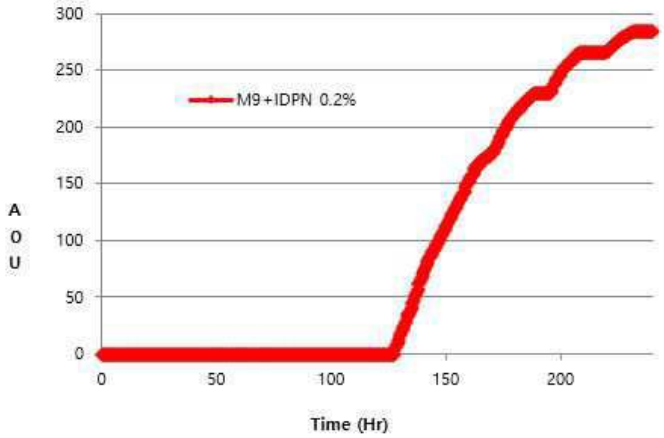

$U_{max(OD)}$ = 0.09013
K_{IDPN} = 2039.1212
0 mg/L
100 mg/L
500 mg/L
1,000 mg/L
3,000 mg/L
6,000 mg/L
IDPN Conc.
IDPN removal
Growth #7
OD595
IDPN removal (%)
Time (hr)

도면7

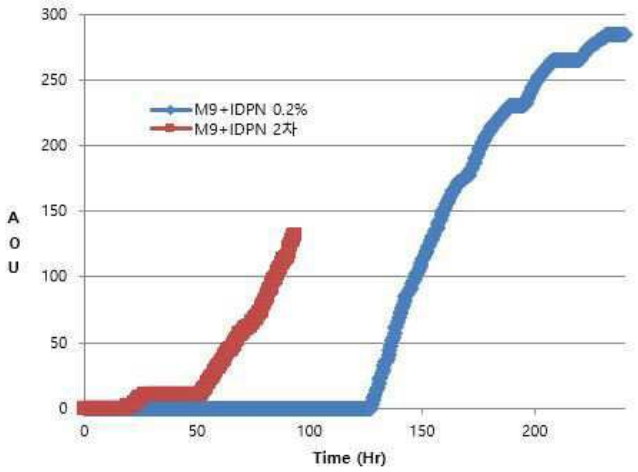


IDPN reduction/OD	0 mg/L	100 mg/L	500 mg/L	1000 mg/L	3000 mg/L	6000 mg/L
0	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
24	0	13.79	-175.89	198.65	**528.85**	-3200.00
48	0	186.84	156.74	**427.94**	-288.46	-90.91
72	0	246.64	462.99	514.23	426.46	**571.07**
96	0	261.06	517.47	**572.08**	365.05	514.03
120	0	277.55	591.82	**630.88**	424.48	608.25

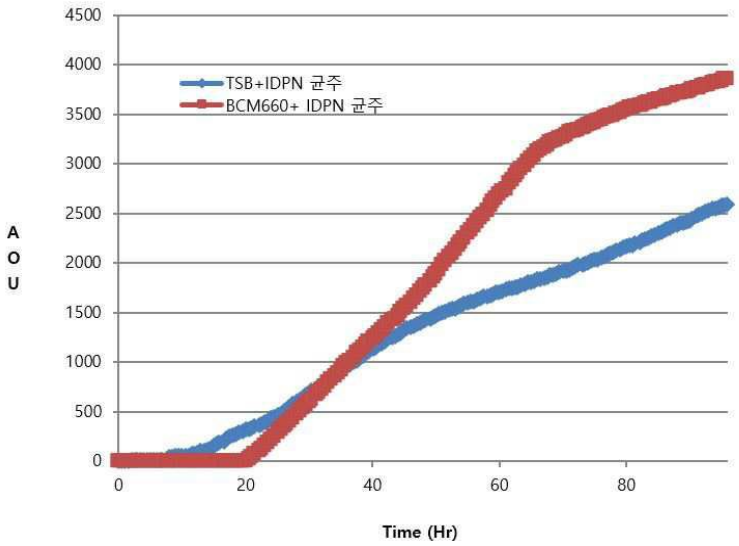
도면8



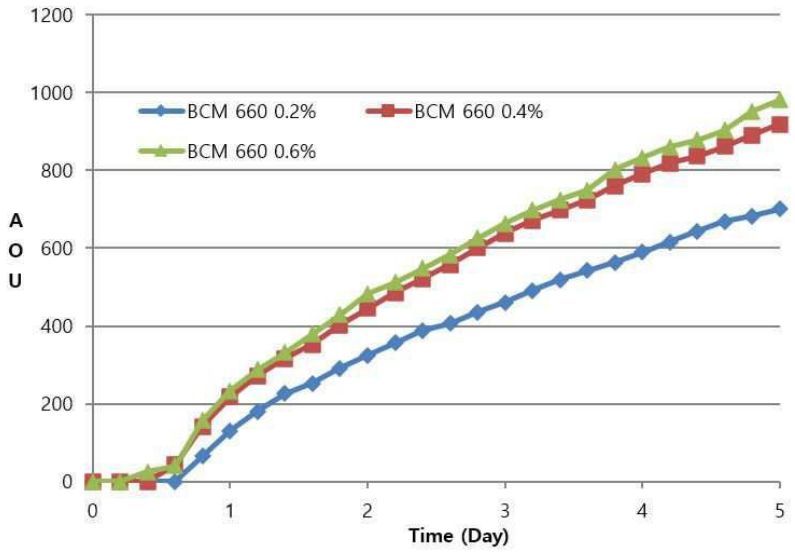
도면9



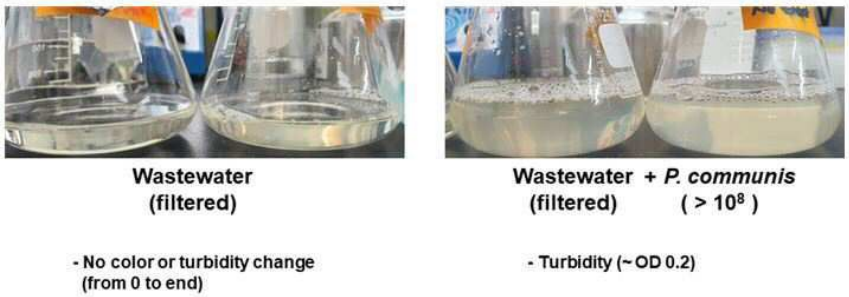
도면10



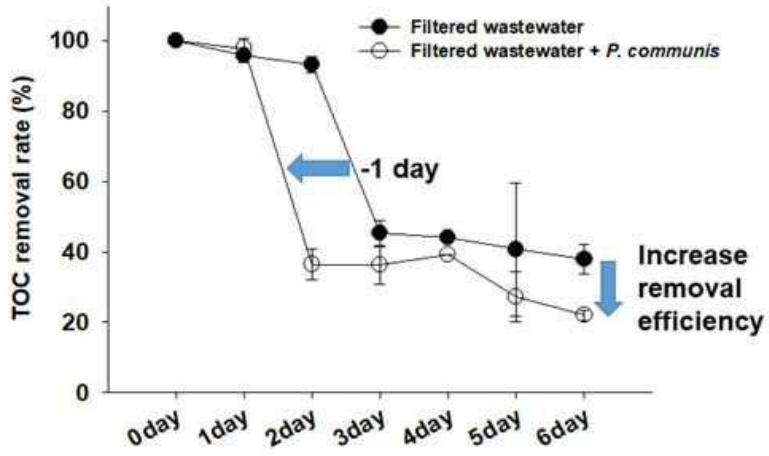
도면11



도면12



도면13


Filtered wastewater
Filtered wastewater + P. communis
TOC removal rate (%)
100
80
60
40
20
0
-1 day
Increase
removal
efficiency
0day
1day
2day
3day
4day
5day
6day