

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(43) 국제공개일
2011년 1월 20일 (20.01.2011)

PCT

(10) 국제공개번호
WO 2011/007906 A1

- (51) 국제특허분류:
C12N 1/20 (2006.01) B09B 3/00 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2009/003906
- (22) 국제출원일: 2009년 7월 15일 (15.07.2009)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): **이화여자대학교 산학협력단 (EWHHA UNIVERSITY-INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION)** [KR/KR]; 서울특별시 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교 내, 120-750 Seoul (KR).
- (72) 발명자: **김**
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): **조정숙 (CHO, Kyung Suk)** [KR/KR]; 서울특별시 서초구 방배동 764-16 서래빌딩 501 호, 137-060 Seoul (KR). **박현정 (PARK, Hyung Jung)** [KR/KR]; 서울특별시 서대문구 홍은동 186-1 미성아파트 1 동 303 호, 120-100 Seoul (KR). **이은희 (LEE, Eun Hee)** [KR/KR]; 서울특별시 구로구 구로동 1259 구일우성아파트 201 동 703 호, 152-050 Seoul (KR). **문경은 (MOON, Kyung Eun)** [KR/KR]; 인천광역시 부평구 부평 1 동 동아아파트 30 동 1301 호, 403-762 Incheon (KR).
- (74) 대리인: **특허법인 다나 (DANA PATENT LAW FIRM)**; 서울특별시 강남구 역삼동 648-1 BYC 빌딩 501 호, 135-080 Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO,

AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

규칙 4.17 에 의한 선언서:

- 신규성을 해치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의 예외에 관한 선언 (규칙 4.17(v))

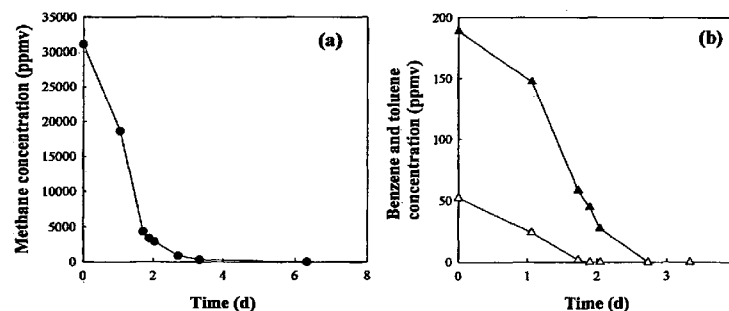
공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 명세서와 별도로 규칙 13 의 2 에 의하여 제출한 기탁된 생물학적 물질에 관한 표시와 함께 (규칙 13 의 2.4(d)(i) 및 48.2(a)(viii))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: NOVEL METHANOTROPHS CUPRIAVIDUS SPP. AND METHOD FOR SIMULTANEOUS-REDUCING METHANE AND VOLATILE ORGANIC COMPOUNDS USING SAME

(54) 발명의 명칭: 신규한 메탄산화세균 큐프리아비더스 속 및 이를 이용한 메탄 및 휘발성유기화합물의 동시 저감방법

[Fig. 6]



(57) Abstract: The present invention relates to novel methanotrophs Cupriavidus spp. and a method for simultaneous-reducing methane and volatile organic compounds using the same. More specifically, novel Cupriavidus spp. bacteria with good methane-degradability can simultaneously and effectively degrade methane and volatile organic compounds.

(57) 요약서: 본 발명은 신규한 메탄산화세균 큐프리아비더스 속 및 이를 이용한 메탄 및 휘발성유기화합물의 동시 저감방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 메탄 분해능이 우수한 신규한 큐프리아비더스 속 세균은 메탄 및 휘발성유기화합물을 동시에 효과적으로 분해할 수 있다.

WO 2011/007906 A1

명세서

신규한 메탄산화세균 큐프리아비더스 속 및 이를 이용한 메탄 및 휘발성유기화합물의 동시 저감방법

기술분야

- [1] 본 발명은 신규한 메탄산화세균 큐프리아비더스 속 및 이를 이용한 메탄 및 휘발성유기화합물의 동시 저감방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 메탄 분해능이 우수한 신규한 큐프리아비더스 속 세균은 메탄 및 휘발성유기화합물을 동시에 효과적으로 분해할 수 있다.

배경기술

- [2] 메탄은 이산화탄소 다음으로 중요한 온실기체로, 전체 대기 복사강제력(radiative forcing)의 18%를 차지한다 (IPCC, The Physical Science Basis. Working Group I Contribution to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (eds Solomon S. *et al.*) (Cambridge University Press, Cambridge, 2007; Dunfield *et al.*, *Nature* 450, 879-882, 2007). 대기 중 메탄 농도는 산업시대 후 두 배 이상 증가하였기 때문에 많은 연구들은 메탄의 발생원(source)과 제거(sink)를 알아내거나 그에 관련한 미생물을 찾는 데 초점 맞춰져 있다 (Bodelier *et al.*, *FEMS Microbiol. Ecol.* 52, 163-174, 2005). 또한, 기존의 연구들은 전지구적 탄소 순환(global carbon cycle)에서 중요한 역할을 하는 메탄산화세균의 서식지에 따른 분포와 다양성을 조사하는데 집중되었다 (evoked, Bodelier *et al.*, *FEMS Microbiol. Ecol.* 52, 163-174, 2005). 대표적인 메탄 발생원으로는 매립지가 있는데, 매립지에서 발생하는 메탄은 미국에서 인위적으로 발생하는 메탄의 약 35% 정도로, 대기 중에 발생하는 global 메탄의 5-10%를 차지하는 것으로 추정된다 (IPCC, 2001; Stern *et al.*, *Waste Manage.* 27, 1248-1258, 2007).
- [3] 매립지는 메탄뿐 아니라 염소계 탄화수소화합물 및 방향족 화합물과 같은 다양한 휘발성유기화합물을 배출하는데 (VOCs, Rettenberger *et al.*, *Landfill gas compounds*. In *Landfilling of waste: biogas*; Christensen, T. H., Cossu, R., Stegmann, R., Eds. E&FN Spoon: London, pp. 51-58, 1996), 휘발성유기화합물은 오존층을 파괴하고 지구 온난화에 기여한다 (Wallington *et al.*, *Environ. Sci. Technol.* 28, 320A-326A, 1994). 매립지에서 배출되는 대표적인 휘발성유기화합물로는 트라이클로로에틸렌(TCE), 테트라클로로에틸렌 (PCE), 벤젠 (benzene), 톨루엔 (toluene) 등으로, 매년 200 가지 이상의 물질이 10^{12} kg 정도 배출된다(Allen *et al.*, *Environ. Sci. Tech.*, 31(4), 1054-1061, 1997; Scheutz *et al.*, *Waste Manage.* 28, 1892-1908, 2008).
- [4] 대기 중 메탄을 제거하는 중요한 두 가지 방법으로는 대류권에서 OH 라디칼과의 반응 ($490 \pm 85 \text{ Tg} \cdot \text{y}^{-1}$)과 약 $30 \pm 15 \text{ Tg} \cdot \text{y}^{-1}$ 으로 추정되는 토양미생물의

산화이 있다 (IPCC, The Science of Climate Change (eds Houghton, J. T. *et al.*). Cambridge University Press, Cambridge. 1996). 메탄산화세균에 의한 미생물 산화는 매립지에서 발생하는 메탄의 저감에 중요한 역할을 하는데 (Scheutz and Kjeldsen, *J. Air & Waste Manage. Assoc.* 55, 878-885, 2005), 매립지 토양에서 미생물 메탄 산화는 실험실 연구 결과를 기초로 하였을 때 10% 내지 50%로 추정되고, 현장 연구에서는 매년 배출되는 메탄의 10% 내지 100%가 산화될 수 있다(Scheutz and Kjeldsen, *J. Air & Waste Manage. Assoc.* 55, 878-885, 2005). 비록 매립지 토양에서 메탄의 자연저감은 매립지의 지구온난화 기여와 관련하여 집중되었지만, 메탄과 동시에 배출되는 휘발성유기화합물까지 동시에 제거할 수 있는 기술 개발은 이루어지지 않았다 (Scheutz and Kjeldsen, *J. Air & Waste Manage. Assoc.* 55, 878-885, 2005).

- [5] 그러므로, 메탄과 휘발성유기화합물을 동시에 제거할 수 있는 기술 개발이 필요하다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 본 발명의 목적은 메탄 및 휘발성유기화합물을 분해할 수 있는 신규의 메탄산화세균을 매립지에서 분리 및 동정하는 것이다.
- [7] 본 발명의 다른 목적은 상기의 신규 메탄산화세균을 이용하여 메탄 및 휘발성유기화합물을 동시에 저감하는 방법을 제공하는 것이다.
- [8] 본 발명의 또 다른 목적은 상기의 신규 메탄산화세균을 이용하여 메탄 및 휘발성유기화합물을 동시에 제거할 수 있는 바이오커버(biocover) 및 이를 포함하는 메탄 및 휘발성유기화합물의 동시 저감 시스템을 제공하는 것이다.
- [9] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 시스템을 이용하여 메탄 및 휘발성유기화합물을 동시에 저감하는 방법을 제공하는 것이다.

기술적 해결방법

- [10] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 큐프리아비더스 속(*Cupriavidus* sp.) MBT14 KCTC 11518BP를 제공한다.
- [11]
- [12] 본 발명은 또한 큐프리아비더스 속(*Cupriavidus* sp.) MBT14 KCTC 11518BP를 포함하는 메탄 및 휘발성유기화합물의 동시 저감용 조성물을 제공한다.
- [13]
- [14] 본 발명은 또한 본 발명의 메탄 및 휘발성유기화합물의 동시 저감용 조성물이 메탄 및 휘발성유기화합물을 분해시키는 단계를 포함하는 메탄 및 휘발성유기화합물의 동시 저감방법을 제공한다.
- [15]
- [16] 본 발명은 또한 본 발명의 메탄 및 휘발성유기화합물의 동시 저감용 조성물을 포함하는, 폐기물 매립지의 복토층 또는 지표면에서 발산되는 메탄 및

휘발성유기화합물의 동시 저감용 바이오커버를 제공한다.

[17]

[18] 본 발명은 또한 폐기물 매립지의 복토층 또는 지표면 위에 바이오 활성층을 설치하여 복토층 또는 지표면에서 발산되는 메탄 및 휘발성유기화합물을 생물학적으로 분해하는 메탄 및 휘발성유기화합물의 동시 저감 시스템에 있어서, 상기 바이오 활성층은

[19] 본 발명의 바이오커버가 하나 이상 적층된 바이오커버층; 및

[20] 상기 바이오커버층을 둘러싸는 통기층을 포함하는 것을 특징으로 하는 메탄 및 휘발성유기화합물의 동시 저감 시스템을 제공한다.

[21]

[22] 본 발명은 또한 폐기물 매립지의 복토층 또는 지표면 위에 바이오 활성층을 설치하여 복토층 또는 지표면에서 발산되는 메탄 및 휘발성유기화합물을 생물학적으로 분해하는 메탄 및 휘발성유기화합물의 동시 저감 시스템에 있어서, 상기 바이오 활성층은

[23] 본 발명의 바이오커버가 하나 이상 적층된 바이오커버층; 및

[24] 상기 바이오커버층 하부에 적층되는 통기층을 포함하는 것을 특징으로 하는 메탄 및 휘발성유기화합물의 동시 저감 시스템을 제공한다.

[25]

[26] 본 발명은 또한 본 발명의 메탄 및 휘발성유기화합물의 동시 저감 시스템에 시료를 주입하여 메탄 및 휘발성유기화합물을 분해시키는 단계를 포함하는 메탄 및 휘발성유기화합물의 동시 저감방법을 제공한다.

유리한 효과

[27] 본 발명의 신규의 메탄산화세균인, 큐프리아비더스 속(*Cupriavidus* sp.)

MBT14는 메탄 및 휘발성유기화합물을 동시에 분해할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[28] 도 1은 매립지 농화배양액의 메탄, 벤젠 및 톨루엔 분해 결과를 나타낸 것으로, ●, 실험군 ○, 대조군 ▲, 벤젠 실험군 ■, 벤젠 대조군 △, 톨루엔 실험군 □, 톨루엔 대조군을 나타낸다.

[29] 도 2는 매립지 컨소시엄 세균 중에서 메탄 산화와 연관된 클론의 계통발생학적 트리를 나타낸 것이다.

[30] 도 3은 컨소시엄 세균 중에서 메탄 및 톨루엔 산화와 연관된 클론의 계통발생학적 트리를 나타낸 것이다.

[31] 도 4는 메탄 및 휘발성유기화합물을 분해하는 본 발명의 큐프리아비더스 속 (*Cupriavidus* sp.) MBT14의 계통발생학적 트리를 나타낸 것이다.

[32] 도 5는 본 발명의 큐프리아비더스 속 (*Cupriavidus* sp.) MBT14를 이용한 실험실 규모의 바이오커버의 설치 도면이다.

[33] 도 6은 본 발명의 큐프리아비더스 속 (*Cupriavidus* sp.) MBT14의 메탄 및 톨루엔

분해 특성을 나타낸 것으로, ●, 메탄 실험군▲, 벤젠 실험군 △, 톨루엔 실험군을 나타낸다.

[34] 도 7은 본 발명의 바이오커버 표면에서 배출되는 메탄, 벤젠 및 톨루엔의 농도를 나타낸 것이다.

[35] 도 8은 본 발명의 바이오커버 높이 별 메탄, 벤젠 및 톨루엔의 농도의 프로파일이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[36] 이하, 본 발명의 구성을 구체적으로 설명한다.

[37] 본 발명은 큐프리아비더스 속(*Cupriavidus* sp.) MBT14 KCTC 11518BP에 관한 것이다.

[38] 본 발명의 미생물은 메탄 및 휘발성유기화합물의 분해능이 우수한 신규 메탄산화세균으로, 매립지 토양과 농화배양배지, 예를 들어 NMS(nitrate mineral salts) 배지를 첨가한 배양병을 밀봉하고, 탄소원으로 메탄 및 휘발성유기화합물을 주입하되, 배양 동안 질소와 인을 계속적으로 공급한 후 농화배양액을 접종원으로 사용하여 메탄 및 휘발성유기화합물의 분해능이 우수한 신규 메탄산화세균, 큐프리아비더스 속(*Cupriavidus* sp.) MBT14를 분리 동정하고, 2009년 6월 3일자로 한국생명공학연구원 생물자원센터에 기탁하여 기탁번호 KCTC 11518BP를 받았다.

[39]

[40] 본 발명은 또한 큐프리아비더스 속(*Cupriavidus* sp.) MBT14 KCTC 11518BP를 포함하는 메탄 및 휘발성유기화합물의 동시 저감용 조성물에 관한 것이다.

[41] 본 발명의 조성물은 메탄 및 휘발성유기화합물을 동시에 저감하기 위해 메탄산화세균으로 본 발명의 신규한 큐프리아비더스 속(*Cupriavidus* sp.) MBT14 KCTC 11518BP를 사용할 수 있다.

[42]

[43] 또한, 본 발명의 메탄 및 휘발성유기화합물의 동시 저감용 조성물은 세균 배양액의 배양 환경 조성을 위해 충전제로 토양, 또는 지렁이 분변토를 더 포함할 수 있다.

[44] 상기 토양은 논/밭 토양, 산림토양, 또는 습지 토양 등을 사용할 수 있으나, 이에 특별히 제한하지는 않는다.

[45] 상기 토양은 표면층에서 100 내지 200 cm 깊이에서 채취한 후, 3 mm 이하의 체로 쳐서 큰 입자는 제거하고 사용할 수 있다.

[46] 또한, 상기 지렁이 분변토는 하수처리과정에서 발생한 하수오니를 지렁이 먹이로 공급하여 생산된 지렁이 분변토로, 6개월 이상 자연 발효/건조과정을 거친 후 불순물을 제거하고 입자 크기가 0.2 내지 2 mm인 것을 사용하는 것이 바람직하다.

[47] 상기 토양과 분변토의 pH는 5 내지 7, 함수량은 1 내지 40%, 유기물 함량은 1

내지 40%로 사용할 수 있으나, 이에 특별히 제한하지는 않는다.

- [48] 또한, 상기 토양 및 지렁이 분변토는 중량 대비 50 : 50 내지 90 : 10의 비율로 혼합되는 것이 바람직하다. 상기 함량 범위 내일 경우, 메탄 및 휘발성유기화합물의 동시 저감 효율이 높다.

[49]

- [50] 본 발명은 또한 본 발명의 메탄 및 휘발성유기화합물의 동시 저감용 조성물이 메탄 및 휘발성유기화합물을 분해시키는 단계를 포함하는 메탄 및 휘발성유기화합물의 동시 저감방법에 관한 것이다.

- [51] 본 발명의 큐프리아비더스 속(*Cupriavidus* sp.) MBT14 KCTC 11518BP 균주는 메탄 및 휘발성유기화합물에 대한 분해능이 우수하여 산소를 이용하여 메탄 또는 휘발성유기화합물을 분해하는 종래기술과는 달리 별도로 산소생성제를 첨가하지 않아도 효과적으로 메탄 및 휘발성유기화합물을 동시에 분해할 수 있다.

[52]

- [53] 본 발명은 또한 본 발명의 메탄 및 휘발성유기화합물의 동시 저감용 조성물을 포함하는, 폐기물 매립지의 복토층 또는 지표면에서 발산되는 메탄 및 휘발성유기화합물의 동시 저감용 바이오커버에 관한 것이다.

- [54] 본 발명의 큐프리아비더스 속(*Cupriavidus* sp.) MBT14 KCTC 11518BP 배양액을 메탄 및 휘발성유기화합물의 동시 저감용 바이오커버에 넣어주고 상기 바이오커버와 메탄 또는 휘발성유기화합물을 접촉시키면 이들이 효과적으로 저감될 수 있다.

- [55] 본 발명의 바이오커버는

- [56] 메탄산화세균을 함유하는 바이오 미디어층; 및

- [57] 상기 바이오 미디어층을 매트 형상으로 유지하는 상부보호시트 및 하부지지시트;

- [58] 상기 상부보호시트, 바이오 미디어층 및 하부지지시트를 서로 결합시키는 결합수단을 포함할 수 있다.

- [59] 상기 바이오 미디어층은 메탄 및 휘발성유기화합물을 생물학적으로 분해할 수 있는 메탄산화세균으로 본 발명의 큐프리아비더스 속(*Cupriavidus* sp.) MBT14 KCTC 11518BP를 포함할 수 있다.

- [60] 또한, 상기 바이오 미디어층은 메탄 및 휘발성유기화합물의 분해 효율을 높이기 위해 통상의 메탄산화세균을 더 포함할 수 있다. 상기 메탄산화세균으로는 메틸로모나스속(*Methylomonas*), 메틸로마이크로비움속(*Methylochromium*), 메틸로박터속(*Methylobacter*), 메틸로칼둠속(*Methylocaldum*), 메틸로파가속(*Methylophaga*), 메틸로사르시나속(*Methylosarcina*), 메틸로써머스속(*Methylothermus*), 메틸로할로비우스속(*Methylohalobius*), 메틸로스파에라속(*Methylosphaera*), 메틸로시스티스속(*Methylocystis*), 메틸로셀라속(*Methylocella*), 메틸로캡사속(*Methylocapsa*), 메틸로시너스속(*Methylosinara*)

Methylosinus), 또는 메틸로코커스속(*Methylococcus*) 등을 단독 또는 2종 이상 사용할 수 있다.

[61]

[62] 본 발명은 또한 폐기물 매립지의 복토층 또는 지표면 위에 바이오 활성층을 설치하여 복토층 또는 지표면에서 발산되는 메탄 및 휘발성유기화합물을 생물학적으로 분해하는 메탄 및 휘발성유기화합물의 동시 저감 시스템에 있어서, 상기 바이오 활성층은

[63] 본 발명의 바이오커버가 하나 이상 적층된 바이오커버층; 및

[64] 상기 바이오커버층을 둘러싸는 통기층을 포함하는 것을 특징으로 하는 메탄 및 휘발성유기화합물의 동시 저감 시스템에 관한 것이다.

[65] 상기 바이오커버층은 메탄산화세균을 포함하고 있어 메탄 및 휘발성유기화합물을 동시에 생물학적으로 분해할 수 있다.

[66] 상기 메탄산화세균으로 본 발명의 신규 큐프리아비더스 속(*Cupriavidus* sp.) MBT14 KCTC 11518BP를 포함할 수 있다.

[67] 상기 메탄산화세균은 전술한 통상의 메탄산화세균을 더 포함할 수 있다.

[68] 또한, 바이오커버층은 메탄 및 휘발성유기화합물의 산화 효율을 높이기 위해 토양 및 지렁이 분변토를 더 포함할 수 있다. 토양 및 지렁이 분변토에 대한 구체적인 사항은 전술한 바와 같다.

[69] 또한, 상기 바이오커버층의 두께는 50 내지 500 mm 인 것이 바람직하다. 상기 두께가 50 mm 미만인 경우, 메탄산화세균과 메탄가스가 접촉할 수 있는 시간이 짧아 산화작용이 충분히 일어나지 않아 메탄가스가 이산화탄소로 전환되지 못한다. 상기 두께가 500 mm를 초과할 경우, 대기에서 확산되는 산소가 바이오커버층의 저면까지 확산하지 못하여 호기성 조건을 조성할 수 없다.

[70] 상기 바이오커버층은 산소를 공급하기 위한 통기층이 둘러싸고 있다. 상기 통기층을 구성하는 성분은 산소 공급이 가능한 입자 크기를 갖는 것이라면 특별히 제한하지는 않는다. 예를 들어, 모래, 또는 자갈로 구성될 수 있다. 또한, 상기 통기층에는 공기를 공급할 수 있는 통기관이 하나 이상 설치되어 있을 수 있다. 상기 통기관을 통해 송풍기로 공기를 주입할 수 있다.

[71]

[72] 본 발명은 또한 폐기물 매립지의 복토층 또는 지표면 위에 바이오 활성층을 설치하여 복토층 또는 지표면에서 발산되는 메탄 및 휘발성유기화합물을 생물학적으로 분해하는 메탄 및 휘발성유기화합물의 동시 저감 시스템에 있어서, 상기 바이오 활성층은

[73] 본 발명의 바이오커버가 하나 이상 적층된 바이오커버층; 및

[74] 상기 바이오커버층 하부에 적층되는 통기층을 포함하는 것을 특징으로 하는 메탄 및 휘발성유기화합물의 동시 저감 시스템에 관한 것이다.

[75] 본 발명의 메탄 및 휘발성유기화합물의 동시 저감 시스템은 복토층과 바이오커버층 사이의 산소를 공급할 수 있는 통기층이 적층될 수 있다.

[76] 상기 통기층을 구성하는 성분은 산소 공급이 가능한 입자 크기를 갖는 것이라면 특별히 제한하지는 않는다. 예를 들어, 모래, 또는 자갈로 구성될 수 있다. 또한, 상기 통기층에는 공기를 공급할 수 있는 통기관이 하나 이상 설치되어 있을 수 있다. 상기 통기관을 통해 송풍기로 공기를 주입할 수 있다.

[77]

[78] 본 발명은 또한 본 발명의 메탄 및 휘발성유기화합물의 동시 저감 시스템에 시료를 주입하여 메탄 및 휘발성유기화합물을 분해시키는 단계를 포함하는 메탄 및 휘발성유기화합물의 동시 저감방법에 관한 것이다.

[79] 본 발명의 메탄 및 휘발성유기화합물의 동시 저감 시스템에 메탄가스 또는 휘발성유기화합물을 주입할 경우 본 발명의 메탄산화세균에 의해 효과적으로 분해될 수 있다.

[80]

[81] 이하, 본 발명에 따르는 실시예 및 본 발명에 따르지 않는 비교예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하나, 본 발명의 범위가 하기 제시된 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

발명의 실시를 위한 형태

[82] <실시예 1> 메탄 및 휘발성유기화합물에 대한 분해 세균 컨소시움 확보

[83] 메탄 및 BT 동시 분해 농화배양액을 얻기 위해 매립지로부터 토양을 채취하였다. 토양 채취 장소는 경기도 가평으로, 매립가스가 계속 배출되고 있는 활동적인 매립지로 표면으로부터 약 10 cm 깊이에서 흙을 채취하였다. 채취한 흙은 아이스박스에 넣어 운반하였고 4°C에서 보관하였다.

[84] 메탄 및 BT를 동시 분해할 수 있는 혼합 균주를 얻기 위해 농화배양을 수행하였다. 미생물 농화배양액을 얻기 위해 600 mL-혈청병에 매립지 토양 (wet landfill soil) 8 g과 nitrate mineral salts (NMS) 배지 20 mL을 넣고 고무마개로 밀봉하였다. 밀봉된 혈청병에 유일 탄소원으로 메탄은 5% (v/v)를, 벤젠과 톨루엔은 각각 111.9, 93.6 μ mole 주입하였고 혈청병은 30°C, 180 rpm에서 배양하였다. 한번 주입한 메탄, 벤젠 및 톨루엔이 100% 제거되면 혈청병 고무마개를 열어 1시간 동안 공기포화를 시켜주었고, 공기포화 후 고무마개를 닫고 메탄, 벤젠 및 톨루엔 각 물질을 동일한 농도로 주입하였다. 질소와 인의 고갈에 따른 저해를 막기 위해 재배양 2번 수행 후 공기포화할 때 질소와 인 농축액을 각각 1 mL씩 넣어주었다.

[85] NMS 배지 조성은 다음과 같다 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g/L; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.295 g/L; KNO_3 1 g/L; KH_2PO_4 0.26 g/L; 0.41 g/L).

[86] 질소와 인 농축액은 NMS 배지조성을 참고하였고, 질소는 KNO_3 를 100 mL 증류수에 2 g을 인은 100 mL 증류수에 KH_2PO_4 0.52 g과 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1.65 g을 넣어 제조하였다.

[87] 농화배양을 진행하면서 메탄, 벤젠 및 톨루엔이 분해되는지 확인하고자 1 mL

gas tight syringe를 이용하여 혈청병의 headspace에서 0.3 mL씩 채취하였다. 채취가스는 왁스컬럼 (Supelco, 30×0.32 mm×0.25 μ m)이 장착된 가스크로마토그래피 (Agilent 6850N, USA)-불꽃 이온화 검출기를 이용하여 분석하였다. 분석 온도는 오븐 100°C, 주입부와 검출부는 230°C 이었다.

- [88] 메탄과 벤젠 및 톨루엔 분해 농화배양액(컨소시움)은 5% 메탄을 65시간 이내에 100% 분해하였고, 벤젠과 톨루엔은 각각 17시간과 13시간 이내에 완전히 분해하였다(도 1). 농화배양액의 메탄, 벤젠 그리고 톨루엔의 분해속도는 메탄이 $4.83 \pm 0.39 \mu\text{mole} \cdot \text{g-dry soil}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 이었고, BT가 $2.71 \pm 0.53 \mu\text{mole} \cdot \text{g-dry soil}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 이었다. 실험 결과로부터 이 컨소시움이 메탄, 벤젠 및 톨루엔을 효과적으로 분해하는 것을 확인하였다.

[89]

- [90] 메탄, 벤젠 및 톨루엔 분해 미생물 컨소시움(농화배양액)의 미생물 군집을 알아보고자 초기 토양 및 농화배양액으로부터 DNA를 추출하였다. 초기 토양의 미생물 군집 분석을 위해 약 0.5 g 토양 (wet soil)을 BIO101 kit를 이용하여 추출하였다. 농화배양액은 메탄, 벤젠 및 톨루엔이 완전히 분해된 후 배양액 1 mL을 14,000×g에서 5분간 원심분리하여 침전물에서 DNA를 추출하였고 토양과 마찬가지로 BIO101 kit을 이용하였다. DNA 추출은 BIO101 kit 방법에 따라 수행하였고 모든 샘플은 2 반복씩 추출하였다.

- [91] 메탄, 벤젠 및 톨루엔 분해 세균 컨소시움의 세균 군집 구조는 PCR-denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) 기법을 이용하여 분석하였다. 우선, 메탄 분해 세균을 증폭하는데 사용한 프라이머 쌍은 A189fGC (5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G GGN GAC TGG GAC TTC TGG-3')와 mb661r (5'-CCG GMG CAA CGT CYT TAC C-3') 이었다.

- [92] 또한, 벤젠 및 톨루엔 분해 세균 검출에 사용한 프라이머 쌍은 TMOAfGC (5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G CGA AAC CGG CTT YAC CAA YAT G-3')과 TMOAr (5'-ACC GGG ATA TTT YTC TTC SAG CCA-3')이었다.

- [93] PCT 증폭 조건은 첫 번째 단계에서 초기변성이 96°C에서 5 분, 두 번째 단계에서 변성 96°C 1 분, 풀림 58°C 1 분, 증폭 72°C 1 분을 40 회 수행하였고, 마지막 단계에서 72°C 5 분으로 실험하였다. 증폭된 DNA 농도를 200-300 ng/ μ l로 맞추는 후 6% 폴리아크릴아마이드 겔에 주입하였다. 우레아의 변화는 35-70%였고 60°C, 50 V에서 17시간 운전하였다. DGGE 실험 후 겔로부터 밴드(band)를 잘랐고, 자른 겔에서 DNA를 추출하였다. 겔로부터 DNA를 추출하기 위해서 멸균수 30 μ l를 첨가하고 -20°C에서 얼렸다. 그 후 70°C에서 3분간 녹이고 잘 섞어 주었다.

- [94] 다음의 과정을 3번 반복한 후 상등액의 DNA를 증폭하였다: 증폭 시 사용 프라이머는 메탄 분해 세균 검출용으로는 A189fGC primer에서 GC 부분을 제외한 프라이머를 사용하였고, 벤젠 및 톨루엔 분해 세균 검출용으로는

TMOAfGC 프라이머에서 GC 부분을 제외한 프라이머를 사용하였다. 증폭된 DNA의 염기서열을 분석하여 동정하였다.

- [95] 도 2에 나타난 바와 같이, 메탄 산화에 관여하는 메탄 모노옥시게나아제 (methane monooxygenase)의 유전자(pmmo)를 검출할 수 있는 A189fGC와 mb661r primer를 이용하여 PCR한 후, DGGE로 분석한 후 얻은 클론의 염기서열을 분석하여 동정한 결과, 메틸로시스티스 속 (*Methylocystis* sp.), 메틸로시너스 속 (*Methylosinus* sp.), 및 메틸로마이크로비움 알BUM (*Methylomicrobium album*) 등과 같은 메탄산화세균이 우점종임을 확인하였다(도 2).
- [96] 또한, 벤젠과 톨루엔 산화에 관여하는 모노옥시게나아제 코딩 유전자를 검출할 수 있는 TMOAfGC와 TMOAr primer를 이용하여 PCR한 후, DGGE로 분석한 후 얻은 클론의 염기서열을 분석하여 동정한 결과, 슈도모나스속 (*Pseudomonas* sp.), 큐프리아비더스 속 (*Cupriavidus* sp.) 및 *Ralstonia* sp. (랄스토니아 속) 등이 우점종임을 알 수 있었다 (도 3).
- [97]
- [98] <실시에 2> 메탄 및 휘발성유기화합물에 대한 분해능을 갖는 신규 메탄산화세균의 분리 및 동정
- [99] 메탄, 벤젠 및 톨루엔을 분해하는 순수균을 분리하기 위해 농화배양액을 접종원으로 사용하여 실험을 수행하였다. 9 mL 0.9% NaCl 용액에 농화배양액 1 mL을 넣고 연속 희석 방법을 이용하여 희석하였다. 희석된 용액을 NMS 한천 배지에 도말한 후 데시케이터에 넣고 20% 메탄을 첨가 후 30°C에 배양하면서 균주 성장을 관찰하였다. 성장된 콜로니를 형태와 색에 따라 4 mL NMS 배지가 포함된 혈청병 2 곳에 접종하고 고무마개로 막은 후 메탄을 5%, 벤젠과 톨루엔은 56, 47 μ mole 각각 주입하였다. 주입 후 headspace의 농도를 시간에 따라 분석하여 메탄과 벤젠 및 톨루엔 분해능을 확인하였다. 분석방법은 위와 동일하다.
- [100] 메탄, 벤젠 및 톨루엔을 분해할 수 있는 순수균을 동정하기 위해 위와 동일한 방법을 이용하여 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA를 27f (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3')와 1492r (5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG AC-3')를 이용하여 증폭하였다. 증폭 조건은 위와 같고 증폭된 시료의 염기서열을 분석하여 동정하였다.
- [101] 메탄 및 BT를 동시 분해할 수 있는 균주 MBT14를 분리하였고, 16S rDNA 부분 염기서열 분석결과, 큐프리아비더스 속 (*Cupriavidus* sp.)에 속하였다. MBT14 균주의 염기서열 결과는 표 1과 같고 MBT14 균주와 유사한 계통발생학적 트리 결과는 도 4에 도시하였다.
- [102] 표 1

큐프리아비더스 속 (*Cupriavidus* sp.) MBT14의 16S rDNA 부분 염기서열
(서열목록 서열번호 1)

```

CAGGCTCAGATGAACGCTGGCGGCATGCCTTACACATGCCAGTCCGACGGCAGCAACGGGCTTCGGGCTGGTGGCGAGTGGCGAA
CGGGTCAGTAATACATCGCAACCTGCGCTCAGTGGGGGAATACAGTCCGAAAGATAGCTAATACCGCATACGACCTGAGGGTGA
AAGCGGGGGACGGGTACGGGCTCGCGCTACAGGAGCGGCGGATTTTGTAGTATAGTTTGGGGGGTANGGCCCTTCCGAGG
GGACGGACCGGTAGCTGGTGGGAGAGGACGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCGACGAT
GGGGAATTTTGGACAAATCGGGGCAACCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCTTCGGGTGTAAAGCACTTTGTCTC
GAAAGAAATGGCTCTGGTTAATACCGGGGTGCGTACCGGTACCGGAACAATAAGCACCGGCTAATACGTGCCAGGAGCGCGG
GTAAACGTAGGGTGGGAGCGTAAATCGGAATACCTGGGCGTAAAGCGTGGCAGGCGGTTTGTAGACAGGCGTGAATCCCC
GAGCTCAACCTGGGAATGGGCTTGTGACTGCAGGCTAGAGTATGTACAGGGGGGTAGAAATCCAGCTGTAGCAGTGAATGCG
GTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCGAGCCCTGGGACGTCACTGACCGTCAATGCAGAAAGCGTGGGAGCAAAAC
AGGATAGATACCTGTGTAGTCCACGCGCTAAACGATGTCAACTAGTTGTGGGATTCATTTCTCAGTAAGGTAGCTAACGCGTG
AAGTTCAGCGGCTGGGAGTACGGTCCGAAATTAAGATCAAAGGAATTCAGCGGGACCCCGCAACACCGGTGCATCATGTGGAT
TAATTCATGCACCGGAAACCTTACCTACCTTCACATGCCACTAACGAAGCAGAGATGCATAGCTGCCCGAAAGGGAAGCT
GGACACAGGTGCTGCTGGCTGTGCTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAAGGAGCGCAACCTTGTCTCTAG
TTGCTACGAAGGGGCACCTAGAGAGACTGCGGCTGACAAACCGGAGGAGGTGGGGAAGAGTCAAGTCTCATGGGCTTAATG
GGTAGGGCTTCACACGTGATACATGGTGGCTACAGAGGCTTCCCAACCGCGAGGGGAGCTAATCCAGAAACGCATCGTAG
TCCGGATCGTAGTGTGCAACTCGACTACGTCAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGGGTGAATACGTTCCCG
GGCTTTGTACAC

```

- [103] 계통발생학적 분석 결과 큐프리아비더스 속 (*Cupriavidus* sp.) MBT14는 다른 큐프리아비더스 (*Cupriavidus*) 및 알칼리게네스 (*Alcaligenes*) 그리고 랄스토니아(*Ralstonia*)종과 유사도가 높았다(도 4). 이러한 결과는 농화배양액에서도 관찰되는데 농화배양액의 벤젠과 톨루엔 분해 세균 군집 결과에서도 큐프리아비더스 (*Cupriavidus*) 및 랄스토니아(*Ralstonia*) 종과 유사도가 높았던 것을 알 수 있었다(도 3). 이러한 결과로 볼 때, 큐프리아비더스 속 (*Cupriavidus* sp.) MBT14 균주가 메탄과 벤젠 및 톨루엔 분해에서 중요한 역할을 하는 것을 알 수 있었다.
- [104] 또한, 도 6에 나타난 바와 같이, 큐프리아비더스 속 (*Cupriavidus* sp.) MBT14의 메탄, 벤젠 및 톨루엔 분해 특성을 알아본 결과 MBT14 균주는 5% 메탄을 6일안에 완전히 분해하였고, 112 μmole 의 BT를 3일안에 100% 분해하였다. MBT14의 메탄 분해속도는 4.3 $\text{mmole}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 이었고, BT의 분해속도는 각각 79.2와 92.4 $\mu\text{mole}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 이었다.따라서, 메탄 및 휘발성유기화합물에 대한 분해능이 우수한 큐프리아비더스 속(*Cupriavidus* sp.) MBT 14를 2009년 6월 3일자로 한국생명공학연구원 생물자원센터에 기탁하여 기탁번호 KCTC 11518BP를 받았다.
- [105]
- [106] <실시예 2> 신규의 메탄산화세균을 이용한 바이오커버 성능 평가
- [107] 매립지를 모사한 실험실 수준의 바이오커버에 큐프리아비더스 속(*Cupriavidus* sp.) MBT 14가 우점하는 미생물 컨소시움을 접종하여, 메탄과 함께 악취성 휘발성유기화합물로서의 벤젠/톨루엔이 생분해되는 프로파일을 살펴보았다.
- [108] 산림토양과 지렁이 분변토를 채취하여 2 mm의 체로 거른 뒤 75:25 (w/w)의

- 비율로 섞어 바이오커버에 각각 채워 넣어 주었는데, 이때 상기 실시예 1의 미생물 컨소시움 배양액 300 mL(2.1×10^8 cells/mL)을 흡과 함께 섞어 넣어주었다.
- [109] 바이오커버는 지름 200 mm, 높이 500 mm의 2단으로 세워졌고, 가장 위 단에는 높이 300 mm의 컬럼이 세워져 매립지 토양과 직접적으로 접해있는 대기의 상태를 모사했다. 컬럼의 가장 아랫부분에서 메탄/이산화탄소(40%/60%) 혼합가스가 10 mL/min의 속도로 주입되었고, 벤젠/톨루엔은 HPLC 펌프를 이용하여 휘발된 상태로 메탄가스와 함께 약 200 ppmv의 농도로 흘러 공급하였다 (도 5). 컬럼의 가장 윗부분에서는 공기가 1.45 atm, 200 mL/min으로 주입되었는데 이는 매립지 토양과 접해있는 대기의 상태를 모사한 것이다. 가스 프로파일은 샘플링 포트로부터 컬럼의 높이 별로 gas tight syringe 를 이용하여 300 μ l씩 채취되어, 캐필러리컬럼 (30 m $\times$ 530 μ m $\times$ 50 μ m)이 장착된 가스크로마토그래피 (Agilent 7890A, 6890N USA)-열전도도 검출기를 이용하여 분석하였다. 메탄, 산소, 질소 가스의 분석 온도는 오븐 50°C, 주입부 200°C, 검출부 250°C 이었다. 이산화탄소의 경우에는 오븐 280°C, 주입부 200°C, 검출부 250°C 이었다. 벤젠과 톨루엔은 농화배양액의 벤젠, 톨루엔 분석조건과 동일하다.
- [110] 도 7 및 8에는 농화배양하여 얻은 미생물 컨소시움을 접종한 산림토양과 지렁이 분변토를 75:25 (w/w)의 비율로 혼합한 토양으로 만든 바이오커버의 메탄, 벤젠, 및 톨루엔 제거 특성을 나타낸 것으로, 메탄의 제거효율은 약 99% 이상이었고, 벤젠과 톨루엔은 거의 100% 제거되어, 바이오커버 표면에서 배출되는 메탄, 벤젠 및 톨루엔은 거의 검출되지 않았다(도 7). 즉, 바이오커버에 의해 메탄과 휘발성유기화합물을 동시에 제거 가능함을 확인할 수 있었다.
- [111] 한편, 메탄은 바이오커버 상부에서 주로 제거되었으나, 벤젠과 톨루엔은 하부에서 제거되었다 (도 8).
- [112]
- [113] <실시예 3> 본 발명의 큐프리아비더스 속 (*Cupriavidus* sp.) MBT14의 기타 오염원에 대한 분해능 조사
- [114] 메탄의 분해능이 우수한 본 발명의 큐프리아비더스 속 (*Cupriavidus* sp.) MBT14의 다른 탄화수소화합물 이용가능성을 알아보기 위하여 총 14개의 물질을 선택하여 이 물질들에 대한 MBT14의 분해능 또는 성장능을 조사하였다.
- [115] 기질 테스트에 사용될 MBT14 균주는 R2A 배지에서 대량 배양되어 washing 후 NMS 배지에 옮겨 접종되었다. 이는 120 mL-혈청병에 4 mL씩 분주되었고, 고무마개로 막은 후 각 물질을 1 μ l씩 주입하였다. 단 OD₆₀₀ 값의 측정하기 위한 메탄올, 에탄올, 아세톤 및 디젤 (Diesel) 분해 확인용 M6 균주는 600 mL-혈청병에 20 mL씩 분주되었고, 고무마개로 막은 후 각 물질은 10 μ l씩 주입되었다.
- [116] 메탄올, 에탄올, 아세톤 및 디젤 (Diesel)을 이용한 성장능은 OD_{600nm} 값의 측정을 통해 분석이 이루어졌고, 나머지 10가지 물질의 분해능은 기질의 농도

측정을 통해 분석이 이루어졌는데, 이때 50 μl gas tight syringe를 이용하여
 혈청병의 headspace에서 30 μl 씩 채취하여 왁스컬럼 (Supelco, 30 $\times$ 0.32 mm $\times$ 0.25
 μm)이 장착된 가스크로마토그래피(Agilent 6850N, USA)-불꽃 이온화 검출기를
 이용하였다. 분석 온도는 오븐 100°C, 주입부와 검출부는 230°C 이었다.

[117] 표 2

큐프리아비더스 속 (*Cupriavidus* sp.) MBT14 균주의 다른 탄화수소화합물에 대한 분해능

기질		기질 이용능
에테르	MTBE	-
사이클로알칸 (알칸)	헥산	-
	사이클로헥산	-
염소화 탄화수소	디클로로메탄	-
	트리클로로에틸렌	-
	테트라클로로에틸렌	-
단일방향족 탄화수소	에틸벤젠	+
	m-자일렌	+
	p-자일렌	+
	o-자일렌	+
알코올	메탄올	+
	에탄올	-
케톤	아세톤	-
오일	디젤	-

[118] 표 2에 나타난 바와 같이, MBT14 균주는 에틸벤젠, m-자일렌, p-자일렌, o-
 -자일렌 및 메탄올을 분해하였다.

산업상 이용가능성

[119] 본 발명은 신규의 큐프리아비더스 속(*Cupriavidus* sp.) MBT14를 이용하여 메탄
 및 휘발성유기화합물을 동시에 분해할 수 있는 바이오커버에 사용할 수 있다.

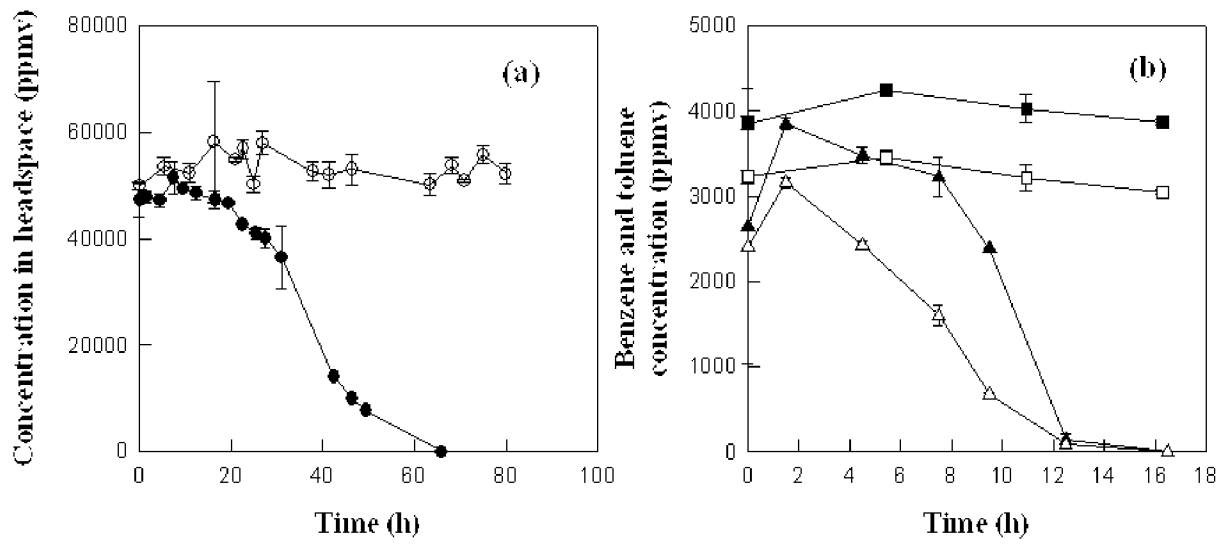
청구범위

- [1] 큐프리아비더스 속(*Cupriavidus* sp.) MBT14 KCTC 11518BP.
- [2] 큐프리아비더스 속(*Cupriavidus* sp.) MBT14 KCTC 11518BP를 포함하는
메탄 및 휘발성유기화합물의 동시 저감용 조성물.
- [3] 제2항에 있어서,
토양 및 지렁이 분변토로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 더
포함하는 메탄 및 휘발성유기화합물의 동시 저감용 조성물.
- [4] 제3항에 있어서,
토양 및 지렁이 분변토는 중량 대비 50 : 50 내지 90 : 10의 비율로 혼합되는
메탄 및 휘발성유기화합물의 동시 저감용 조성물.
- [5] 제2항의 메탄 및 휘발성유기화합물의 동시 저감용 조성물이 메탄 및
휘발성유기화합물을 분해시키는 단계를 포함하는 메탄 및
휘발성유기화합물의 동시 저감방법.
- [6] 제2항의 메탄 및 휘발성유기화합물의 동시 저감용 조성물을 포함하는,
폐기물 매립지의 복토층 또는 지표면에서 발산되는 메탄 및
휘발성유기화합물의 동시 저감용 바이오커버.
- [7] 제6항에 있어서,
메틸로모나스속(*Methylomonas*), 메틸로마이크로비움속(*Methylomicrobium*),
메틸로박터속(*Methylobacter*), 메틸로칼둠속(*Methylocaldum*),
메틸로파가속(*Methylophaga*), 메틸로사르시나속(*Methylosarcina*),
메틸로써머스속(*Methylothermus*), 메틸로할로비우스속(*Methylohalobius*),
메틸로스파에라속(*Methylosphaera*), 메틸로시스티스속(*Methylocystis*),
메틸로셀라속(*Methylocella*), 메틸로캡사속(*Methylocapsa*), 메틸로시너스속(*Methylosinus*) 및 메틸로코커스속(*Methylococcus*)으로 이루어진 군으로부터
선택된 하나 이상의 메탄산화세균을 더 포함하는 메탄 및
휘발성유기화합물의 동시 저감용 바이오커버.
- [8] 폐기물 매립지의 복토층 또는 지표면 위에 바이오 활성층을 설치하여
복토층 또는 지표면에서 발산되는 메탄 및 휘발성유기화합물을
생물학적으로 분해하는 메탄 및 휘발성유기화합물의 동시 저감 시스템에
있어서, 상기 바이오 활성층은
제6항의 바이오커버가 하나 이상 적층된 바이오커버층; 및
상기 바이오커버층을 둘러싸는 통기층을 포함하는 것을 특징으로 하는
메탄 및 휘발성유기화합물의 동시 저감 시스템.
- [9] 폐기물 매립지의 복토층 또는 지표면 위에 바이오 활성층을 설치하여
복토층 또는 지표면에서 발산되는 메탄 및 휘발성유기화합물을
생물학적으로 분해하는 메탄 및 휘발성유기화합물의 동시 저감 시스템에
있어서, 상기 바이오 활성층은

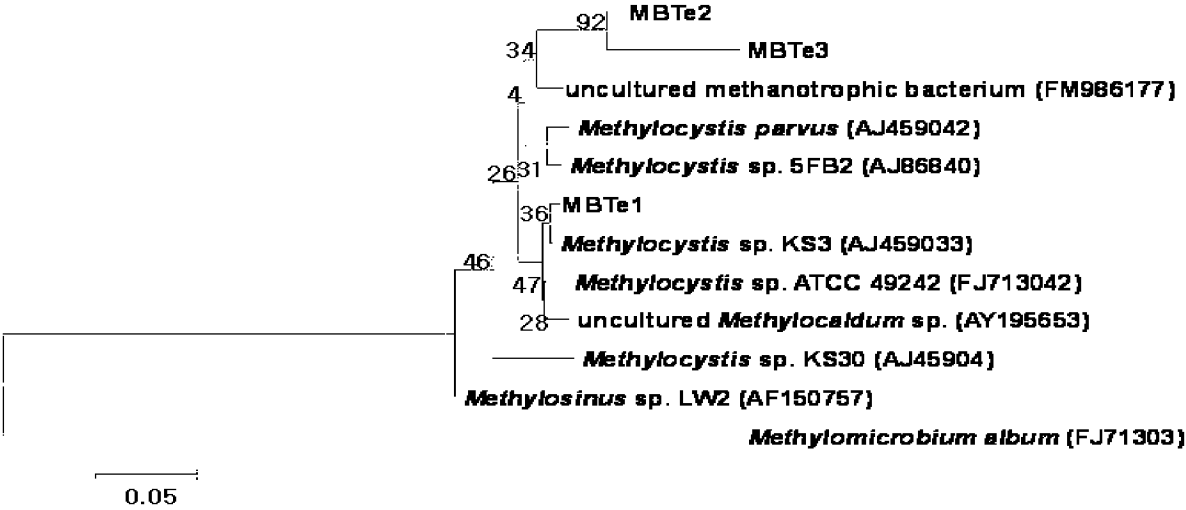
제6항의 바이오커버가 하나 이상 적층된 바이오커버층; 및
상기 바이오커버층 하부에 적층되는 통기층을 포함하는 것을 특징으로
하는 메탄 및 휘발성유기화합물의 동시 저감 시스템.

- [10] 제8항 또는 제9항의 메탄 및 휘발성유기화합물의 동시 저감 시스템에
시료를 주입하여 메탄 및 휘발성유기화합물을 분해시키는 단계를
포함하는 메탄 및 휘발성유기화합물의 동시 저감방법.

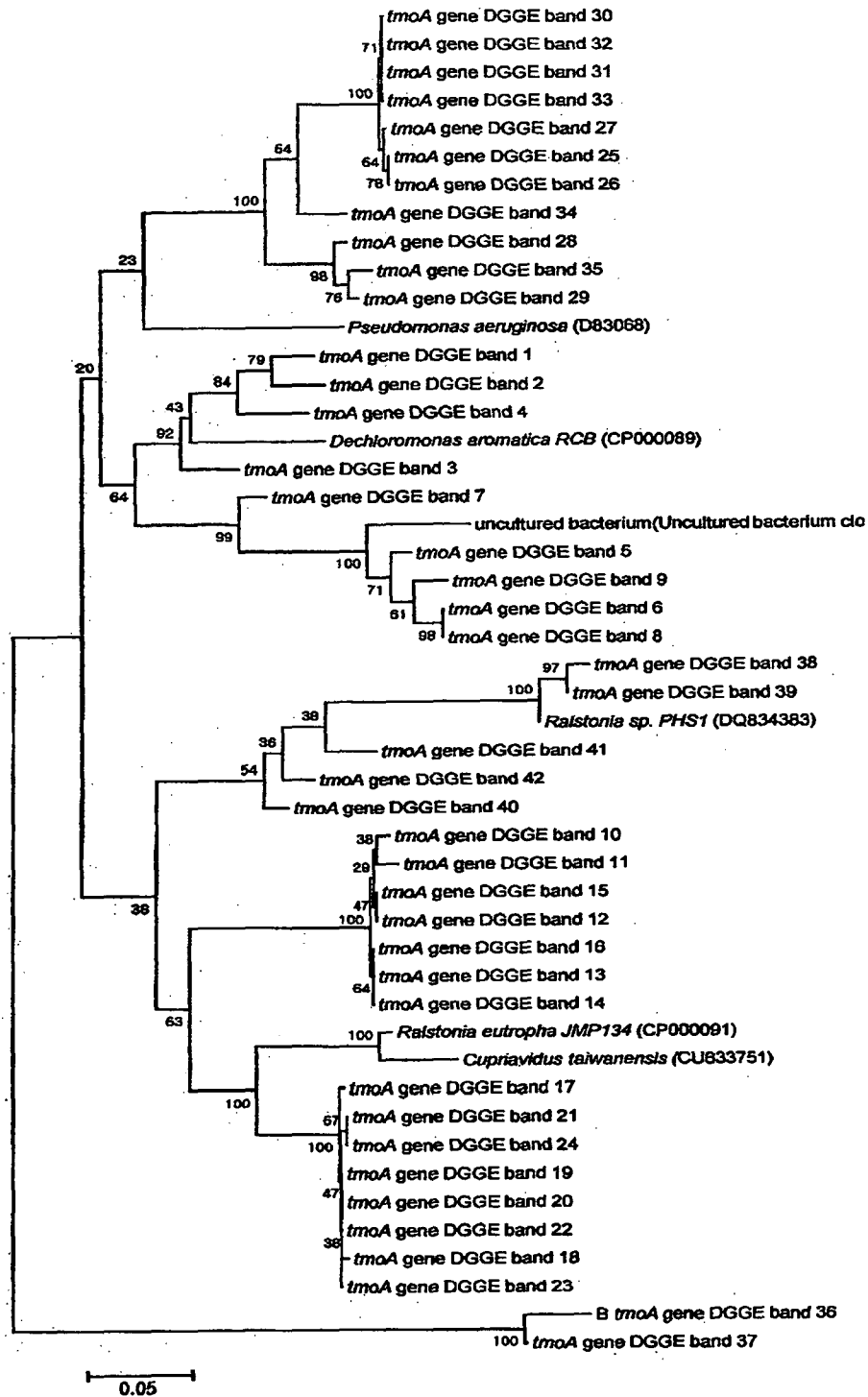
[Fig. 1]



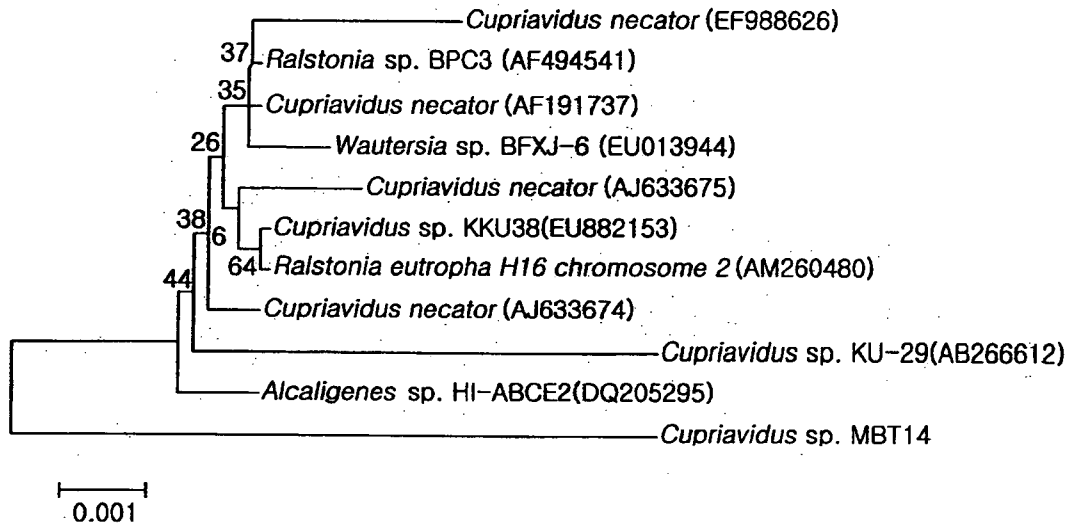
[Fig. 2]



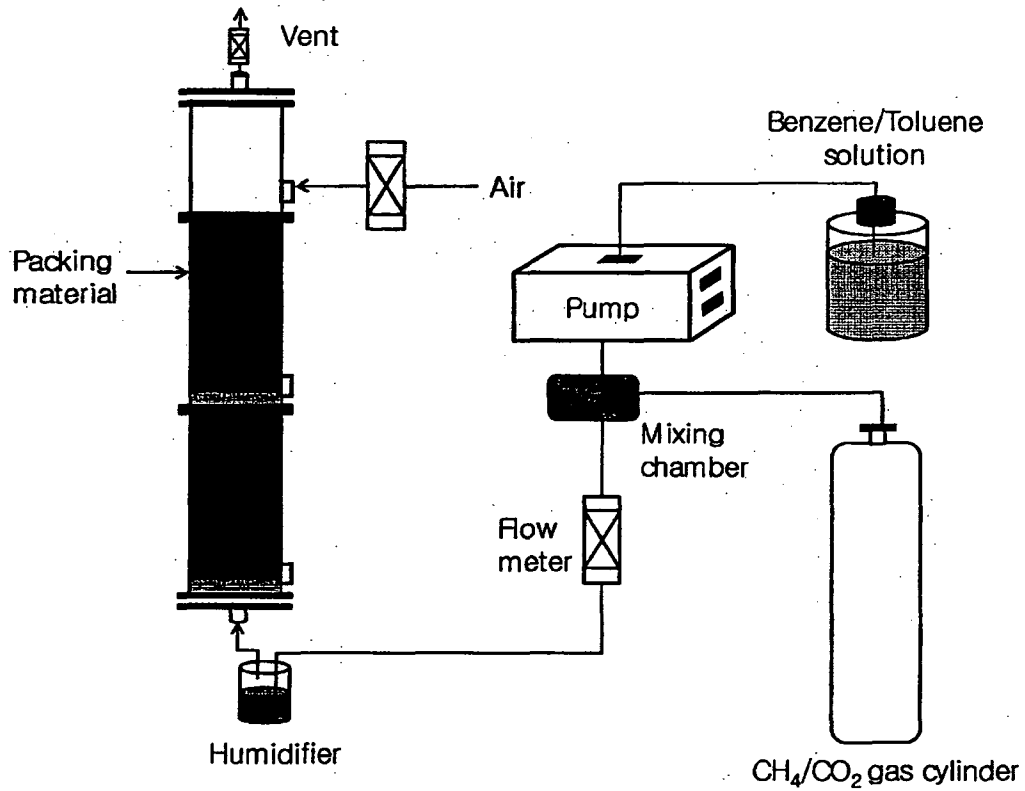
[Fig. 3]



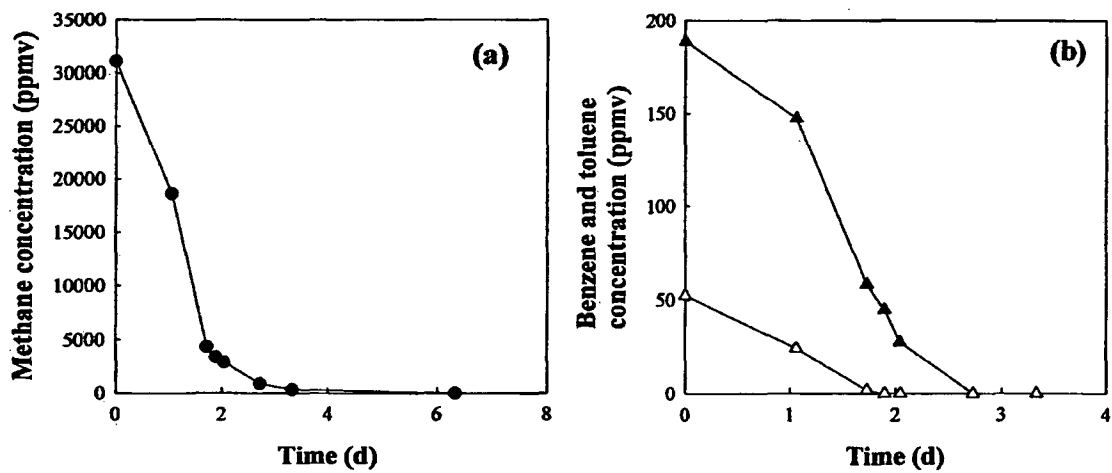
[Fig. 4]



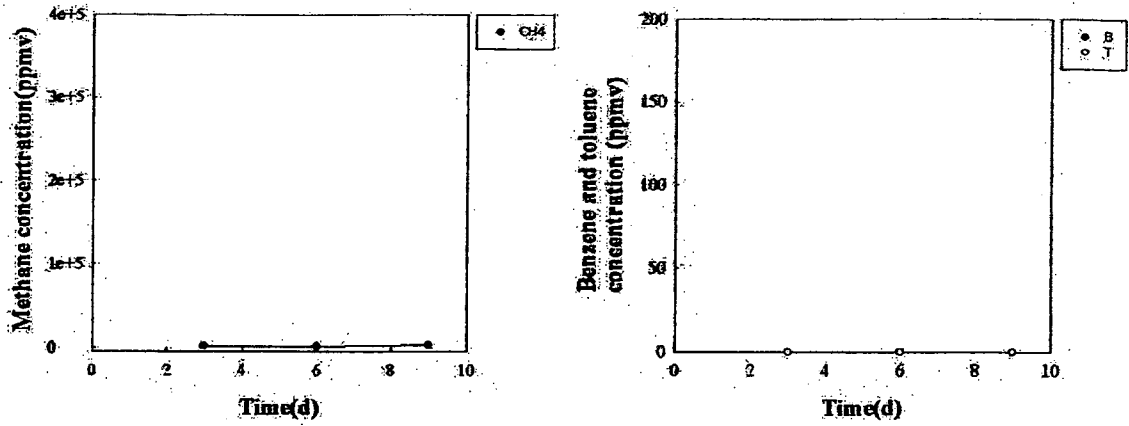
[Fig. 5]



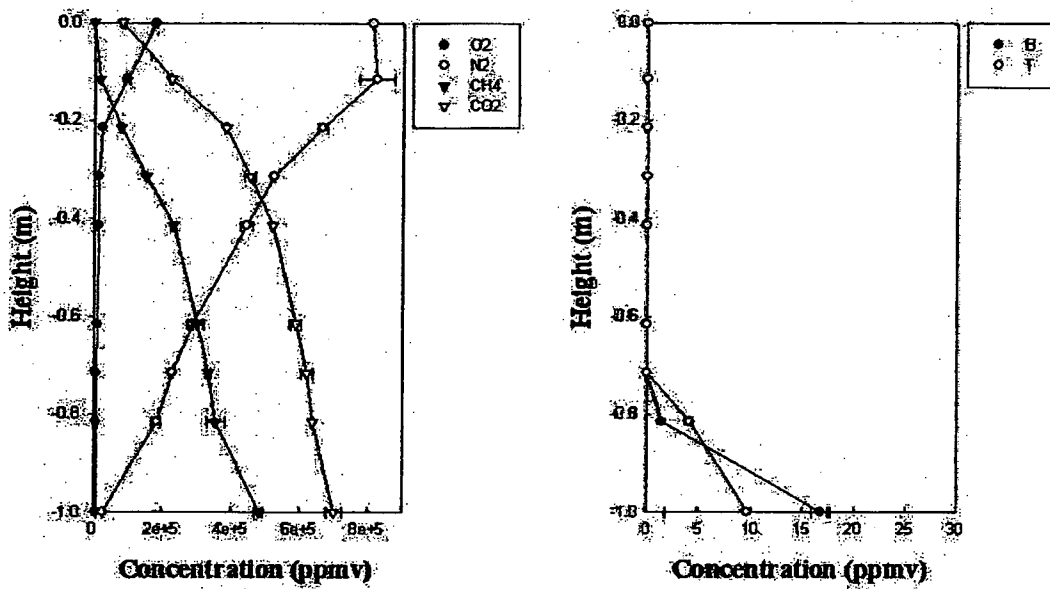
[Fig. 6]



[Fig. 7]



[Fig. 8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2009/003906**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C12N 1/20(2006.01)i, B09B 3/00(2006.01)i***

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 1/20; C12N 1/26; C12N 1/30

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: Cupriavidus sp. MBT14, methane, benzene, toluene, simultaneous reduction

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EU882153 (A Reungsang & N Pummipuk) 28 July 2008 - See Cupriavidus taiwanensis 16S rRNA genome sequence listing.	1-10
A	Claire Amadou et al., 'Genome sequence of the beta-rhizobium Cupriavidus taiwanensis and comparative genomics of rhizobia', Genome Res., 19 May 2008, Vol. 18, pages 1472-1483 - See the entire document.	1-10
A	RM Wittich et al., 'Growth of the genetically engineered strain Cupriavidus necator RW112 with chlorobenzoates and technical chlorobiphenyls', Microbiology, 2007, Vol. 153, pages 186-195 - See the entire document.	1-10
A	L Avoscan et al., 'Seleno-L-Methionine Is the Predominant Organic Form of Selenium in Cupriavidus metallidurans CH34 Exposed to Selenite or Selenate', APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Sept. 2006, Vol. 72, No. 9, pages 6414-6416 - See the entire document	1-10



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 APRIL 2010 (15.04.2010)

Date of mailing of the international search report

16 APRIL 2010 (16.04.2010)

Name and mailing address of the ISA/KR



Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2009/003906**Box No. I** Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:

a. (means)



on paper



in electronic form

b. (time)



in the international application as filed



together with the international application in electronic form



subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2009/003906

Patent document
cited in search report

Publication
date

Patent family
member

Publication
date

NONE

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 1/20(2006.01)i, B09B 3/00(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 1/20; C12N 1/26; C12N 1/30 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: Cupriavidus sp. MBT14, 메탄, 벤젠, 톨루엔, 동시 저감		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	EU882153 (A Reungsang & N Pummipuk) 28 Jul 2008 - Cupriavidus 속 균주 16S rRNA 유전자 서열 참조.	1-10
A	Claire Amadou 외 19명, 'Genome sequence of the beta-rhizobium Cupriavidus taiwanensis and comparative genomics of rhizobia', Genome Res., 19 May 2008, Vol. 18, pages 1472-1483 - 전체 문헌 참조.	1-10
A	RM Wittich 외 1명, 'Growth of the genetically engineered strain Cupriavidus necator RW112 with chlorobenzoates and technical chlorobiphenyls', Microbiology, 2007, Vol. 153, pages 186-195 - 전체 문헌 참조.	1-10
A	L Avoscan 외 4명, 'Seleno-L-Methionine Is the Predominant Organic Form of Selenium in Cupriavidus metallidurans CH34 Exposed to Selenite or Selenate', APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Sept. 2006, Vol. 72, No. 9, pages 6414-6416 - 전체 문헌 참조.	1-10
☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2010년 04월 15일 (15.04.2010)		국제조사보고서 발송일 2010년 04월 16일 (16.04.2010)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 선사로 139, 정부대전청사 팩스 번호 82-42-472-7140		심사관 김정희 전화번호 82-42-481-8191 

제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.

a. 출원시 또는 추후 제출된 서열목록



서면



전자적 형태

b. 제출시기



출원시 국제출원에 포함



전자적 형태로 국제출원과 함께 제출



조사를 위해 본 기관에 추후 제출

2. ☐ 추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시의 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.

3. 추가 의견:

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

없음