



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0109632
(43) 공개일자 2013년10월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 1/14 (2006.01) B09C 1/10 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-0031533

(22) 출원일자 2012년03월28일

심사청구일자 2012년03월28일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가 1

(72) 발명자

김규혁

서울특별시 강남구 대치1동 612 국제아파트 3-703

이환휘

서울특별시 동대문구 이문1동 304-9 B 101호

김재진

서울특별시 강남구 역삼2동 716 동부센트레빌아파트 1308호

(74) 대리인

한양특허법인

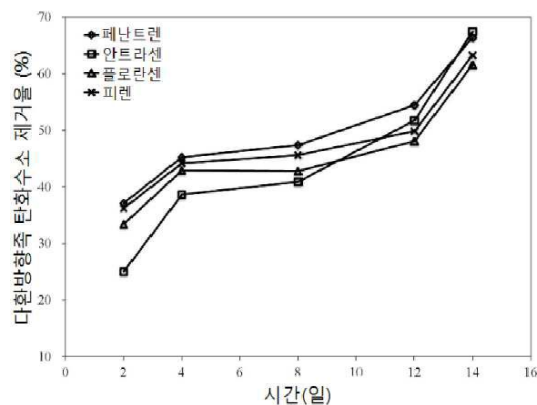
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 다환방향족 탄화수소 분해용 조성물 및 다환방향족 탄화수소의 분해 방법

(57) 요약

본 발명은 다환방향족 탄화수소 분해용 조성물 및 다환방향족 탄화수소의 분해 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 플레비아 브레비스포라 KUC9045(*Phlebia brevispora* KUC9045)(기탁번호: KACC93149P)를 포함하는 다환방향족 탄화수소 분해용 조성물 및 플레비아 브레비스포라 KUC9045(*Phlebia brevispora* KUC9045)(기탁번호: KACC93149P)를 이용하는 다환방향족 탄화수소의 분해 방법으로, 오염토양 복원 공정 등에 적용하여 생태계 복원에 유용한 균주에 관한 것이다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 S121011L110120

부처명 산림청

연구사업명 산림과학기술개발사업

연구과제명 [세부] 국내 수집 목재미생물의 기초 특성 조사

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2011.04.01 ~ 2012.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

플레비아 브레비스포라 KUC9045(*Phlebia brevispora* KUC9045)(기탁번호: KACC93149P)를 포함하는 다환방향족 탄화수소 분해용 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 다환방향족 탄화수소는 페난트렌, 안트라센, 플로란센 및 피렌으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 화합물인 것을 특징으로 하는 다환방향족 탄화수소 분해용 조성물.

청구항 3

플레비아 브레비스포라 KUC9045(*Phlebia brevispora* KUC9045)(기탁번호: KACC93149P)를 이용하는 다환방향족 탄화수소의 분해 방법.

청구항 4

청구항 3에 있어서, 다환방향족 탄화수소를 포함하는 배지를 조성하는 단계 및 상기 배지에 상기 플레비아 브레비스포라 KUC9045(*Phlebia brevispora* KUC9045)(기탁번호: KACC93149P)를 배양하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 다환방향족 탄화수소의 분해 방법.

청구항 5

청구항 3에 있어서, 상기 다환방향족 탄화수소는 페난트렌, 안트라센, 플로란센 및 피렌으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 화합물인 것을 특징으로 하는 다환방향족 탄화수소의 분해 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 다환방향족 탄화수소 분해용 조성물 및 다환방향족 탄화수소의 분해 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 다환방향족 탄화수소(Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs)란 2가지 이상의 방향족 고리 화합물 융합된 유기화합물이다. 상기 다환방향족 탄화수소는 다양한 오염원을 통해 발생하는 난분해성 물질로, 토양오염의 주된 원인이 된다. 상기 다환방향족 탄화수소는 수백 여종의 개별물질이 불완전연소 또는 유기물의 열분해로 발생되고, 환경 및 인체에 다양한 문제를 유발시키는 오염원이다.

[0003] 오염된 토양을 정화하는 방법에는 여러 가지의 방식이 있지만, 최근 국내외적으로 철분법과 생물학적 환경복원(Bioremediation)방식의 비중이 크게 증가되었다. 생물학적 환경복원(Bioremediation) 방식은 미생물을 이용하여, 토양 및 지하수의 중금속·유기화합물 등을 분해하여 원래의 양호한 상태로 회복시키는 기술로서, 에너지가 적게 투입되고 현장처리가 가능하며 오염물질을 무독화 시키기 때문에 2차오염의 염려가 없는 효과적인 방법으로, 상기 생물학적 환경복원(Bioremediation)는 최근 지속적으로 증가되고 있는 유망사업 분야이다.

[0004] 한편, 백색부후균(White rot fungus)은 난분해성 물질 및 오염물질을 잘 분해하는 곰팡이로 생물학적 환경복원에 고부가 가치를 나타내는 것으로 알려져 있다. 상기 백색부후균은 목재의 구성성분인 리그닌, 셀룰로오스, 헤미 셀룰로오스 중 쉽게 분해되지 않는 리그닌에 대한 분해 특성이 있는 것으로 알려져 있다.

[0005] 난분해성 오염물질에 대한 환경 내의 오염농도 분석 등 장기적인 모니터링은 이루어지고 있지만, 사실상 배출기준과 사용규제에 관한 관리 측면만 부각되어 물질분해와 관련한 실제적인 환경복원 사업 진행이 미비하고, 미생물 등을 이용하여 실제 오염된 토양을 정화하는 공정 등의 개발이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제2011-0059478호

비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) Applied microbiology and biotechnology Volume 73, Number 4 932-940 ISSN 0175-7598

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 상기와 같은 종래기술의 문제점을 해결하기 위한 것으로서, 실제 오염된 토양 등에 포함된 다환방향족 탄화수소를 제거하는데 우수한 백색부후균으로 플레비아 브레비스포라 KUC9045(*Phlebia brevispora* KUC9045)(기탁번호: KACC93149P)를 포함하는 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 백색부후균인 플레비아 브레비스포라 KUC9045(*Phlebia brevispora* KUC9045)(기탁번호: KACC93149P)를 이용하여 실제 오염된 토양 등에 포함된 다환방향족 탄화수소를 제거하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 플레비아 브레비스포라 KUC9045(*Phlebia brevispora* KUC9045)(기탁번호: KACC93149P)를 포함하는 다환방향족 탄화수소 분해용 조성물을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 플레비아 브레비스포라 KUC9045(*Phlebia brevispora* KUC9045)(기탁번호: KACC93149P)를 이용하는 다환방향족 탄화수소의 분해 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명의 플레비아 브레비스포라 KUC9045(*Phlebia brevispora* KUC9045)(기탁번호: KACC93149P)를 포함하는 조성물은 실제 오염된 토양 등의 정화 공정에서 다환방향족 탄화수소 분해에 적합한 조성물을 제공할 수 있다. 또한, 백색부후균으로 플레비아 브레비스포라 KUC9045(*Phlebia brevispora* KUC9045)(기탁번호: KACC93149P)는 실제 오염된 토양의 정화 공정에 적용하여 기존 물리·화학적 공정을 대체할 수 있다.

[0013] 또한, 백색부후균 중 국내종을 이용한 토양 정화 방법을 통하여 생태계가 교란되는 문제를 해결할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 시간에 따른 다환방향족 탄화수소의 제거율을 나타내는 그래프이다.

도 2는 시간에 따른 리그닌 분해 효소의 활성을 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0016] 본 발명은 플레비아 브레비스포라 KUC9045(*Phlebia brevispora* KUC9045)(기탁번호: KACC93149P)를 포함하는 다환방향족 탄화수소 분해용 조성물을 제공한다. 상기 플레비아 브레비스포라 KUC9045(*Phlebia brevispora* KUC9045)(기탁번호: KACC93149P)는 백색부후균의 하나로, 환경 위해성 표준물질의 하나인 다환방향족 탄화수소의 분해능력이 우수하다. 상기 플레비아 브레비스포라 KUC9045(*Phlebia brevispora* KUC9045)(기탁번호: KACC93149P)는 2% 맥아추출물 아가(malt extract agar) 고체 배지에서 생장할 수 있으며, 최적생육온도는 28 내지 32℃, 바람직하게는 30℃인 것이 좋다. 또한, 상기 최적생육온도에서는 10 내지 12mm/day의 생장량을 나타내는 담자균류에 속한다. 또한 상기 플레비아 브레비스포라 KUC9045(*Phlebia brevispora* KUC9045)(기탁번호: KACC93149P)는 플레비아 브레비스포라(*Phlebia brevispora*, DNA accession number AB084614(GenBank))와 98.6%의 동질성이 확인되었다.

- [0017] 다환방향족 탄화수소(Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs)란 2가지 이상의 방향족 고리가 융합된 유기화합물로, 실온에서 다환방향족 탄화수소는 고체상태이며, 이 부류화합물은 비점과 융점이 높으나 증기압이 낮고, 분자량 증가에 따라 극히 낮은 수용해도를 나타내는 것이 일반적인 성질이다.
- [0018] 다환방향족 탄화수소는 수백 여종의 개별물질이 불완전연소 혹은 유기물의 열분해로 발생되어, 환경 및 인체에 대한 중요한 오염원이 되고 있다. 석탄연소 배출물, 자동차배출가스, 폐자동차오일, 담배연기와 같은 여러 매체에 대한 연구에서 이들 혼합물중의 다환방향족 탄화수소가 잠재적 발암성이 있음이 밝혀졌다.
- [0019] 상기 다환방향족 탄화수소는 페난트렌, 안트라센, 플로란센 및 피렌으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 화합물인 것이 바람직하다. 상기 페난트렌, 안트라센, 플로란센 및 피렌은 다환방향족 탄화수소 중에서 쉽게 분해되기 어려운 화합물로, 본 발명의 플레비아 브레비스포라 KUC9045(*Phlebia brevispora* KUC9045)(기탁번호: KACC93149P)에 의해 생산되는 리그닌 분해 효소로, 라카아제(laccase), 망간 퍼옥시데이즈(manganase dependant peroxidase) 등에 의하여 쉽게 분해될 수 있다. 또한, 상기 페난트렌, 안트라센, 플로란센 및 피렌이 하나 이상 혼합되어 있는 경우에도, 상기 플레비아 브레비스포라 KUC9045(*Phlebia brevispora* KUC9045)(기탁번호: KACC93149P)에 의하여 쉽게 분해되어, 실험실 수준 이외에 실제 토양 오염의 정화 등을 위해 적용할 수 있는 균주를 제공할 수 있다.
- [0020] 본 발명은 플레비아 브레비스포라 KUC9045(*Phlebia brevispora* KUC9045)(기탁번호: KACC93149P)를 이용하는 다환방향족 탄화수소의 분해 방법을 제공한다. 구체적으로, 상기 다환방향족 탄화수소의 분해 방법은, 다환방향족 탄화수소를 포함하는 배지를 조성하는 단계 및 상기 배지에 상기 플레비아 브레비스포라 KUC9045(*Phlebia brevispora* KUC9045)(기탁번호: KACC93149P)를 배양하는 단계를 포함하는 것이 바람직하다.
- [0021] 이때, 상기 배양하는 단계는 2% 맥아 추출물(malt extract, ME) 용액 100mL이 포함된 삼각플라스크를 121℃에서 15분간 고압 멸균 후, 1mL의 아세톤에 용해시킨 페난트렌, 안트라센, 플루오란센 및 피렌을 각각 50mg/L씩 첨가하여 준비하고, 상기 준비된 액체배지에 2% 맥아 추출물 아가(malt extract agar, MEA) 배지에서 전 배양된 균주의 fungal disk(직경 5mm)10개를 접종하여 27℃, 150rpm조건에서 14일간 진탕배양을 실시하여 배양하는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 배양 조건에서, 플레비아 브레비스포라 KUC9045(*Phlebia brevispora* KUC9045)(기탁번호: KACC93149P)가 높은 생산성을 나타내며, 다환방향족 탄화수소를 분해하는 효소의 생산성이 높게 나타난다.
- [0022] 또한, 상기 다환방향족 탄화수소는 페난트렌, 안트라센, 플로란센 및 피렌으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 화합물인 것이 바람직하다. 상기 페난트렌, 안트라센, 플로란센 및 피렌은 다환방향족 탄화수소 중 분해되기 어려운 화합물로, 본 발명의 플레비아 브레비스포라 KUC9045(*Phlebia brevispora* KUC9045)(기탁번호: KACC93149P)에 의해 생산되는 리그닌 분해 효소로, 라카아제(laccase), 망간 퍼옥시데이즈(manganase dependant peroxidase) 등에 의하여 쉽게 분해될 수 있다. 또한, 상기 페난트렌, 안트라센, 플로란센 및 피렌이 하나 이상 혼합되어 있는 경우에도, 상기 플레비아 브레비스포라 KUC9045(*Phlebia brevispora* KUC9045)(기탁번호: KACC93149P)에 의하여 쉽게 분해되어, 실험실 수준 이외에 실제 토양 오염의 정화 등을 위해 적용할 수 있는 균주를 제공할 수 있다.
- [0023] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.
- [0024] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0025] <참조예 1: 고체배지에서 염료 제거 우수 균주 선발>
- [0026] 서울·경기 지역을 포함한 국내 산림의 수목에서 균주를 채집하여 2% 맥아 추출물 아가(malt extract agar) 배지에 균주를 분리하였다. 분리한 균주를 형태와 DNA로 동정하였고, 동정된 균주는 4℃에서 보관 상태(stock)로 보관하였다. 확보된 백색부후균 221점을 대상으로 안트라퀴논계 염료 레마졸 브릴리언트 블루 R(remazol brilliant blue R, RBBR)시험을 실시하여 염료의 제거능력을 평가하였다.
- [0027] 상기 레마졸 브릴리언트 블루 R 시험을 위해 상기 백색부후균 221점을 각각 레마졸 브릴리언트 블루 R 100mg/L가 첨가된 2% 맥아추출물 아가(malt extract agar, MEA) 배지에 접종하여 상온(25℃)에서 7일간 배양하고, 이후 상기 배지의 색 변화를 육안으로 관찰하였다.
- [0028] 배양 7일 후 상기 백색부후균이 접종된 배지의 중앙부를 중심으로 레마졸 브릴리언트 블루 R의 색이 완전히 제거되었는지를 평가하였고, 독일가문비(*Picea abies*)의 원목(log)에서 분리한 플레비아 브레비스포라

KUC9045(*Phlebia brevispora* KUC9045)(기탁번호: KACC93149P)의 경우 5일 경과후 완전히 염료를 제거하였다.

[0029] <참조예 2: 고체배지에서 염료 제거 우수 균주 선발>

[0030] 국내의 다양한 기주로부터 분리·수집한 백색부후균 221점을 대상으로 바벤담(Bavendamm)시험을 실시하여 염료의 제거능력을 평가하였다.

[0031] 0.5중량% 갈릭산(gallic acid)이 첨가된 1.5중량% 맥아추출물과 2중량% 아가 고체배지에 상기 백색부후균 221점을 각각 접종하여 상온(25℃)에서 14일간 배양한 후 배지의 색 변화를 관찰하였다.

[0032] 플레비아 브레비스포라 KUC9045(*Phlebia brevispora* KUC9045)(기탁번호: KACC93149P)의 경우 짙은 갈색(dark brown)을 나타내었으며, 이를 통해 노란색(yellow), 황갈색(yellowish brown), 갈색(brown)을 나타내는 다른 균주에 비하여 가장 강한 산화반응을 나타낸다는 것을 알 수 있다.

표 1

[0033]	균의 종	부후 타입	최적온도	성장율	RBBR 시험	바벤담 반응
	플레비아 브레비스포라 KUC9045 (<i>Phlebia brevispora</i> KUC9045)	백색부후	30℃	10.84mm/day	5일	짙은 갈색

[0034] <실시에 1: 플레비아 브레비스포라 KUC9045(*Phlebia brevispora* KUC9045)>

[0035] 2% 맥아추출물 (malt extract, ME) 용액 100mL이 포함된 250mL 삼각 플라스크를 121℃에서 15분간 고압 멸균 후, 페난트렌(phenanthrene), 안트라센(anthracene), 플로란센(fluoranthene) 및 피렌(pyrene)을 1mL의 아세톤에 용해시키고, 각각 50mg/L씩 상기 삼각플라스크에 첨가하여 액체배지를 준비하였다.

[0036] 상기 액체배지에 2% 맥아추출물 아가(malt extract agar, MEA) 배지에서 전배양된 플레비아 브레비스포라 KUC9045(*Phlebia brevispora* KUC9045)(기탁번호: KACC93149P)를 직경 5mm 크기로 10개를 접종하여 27℃, 150rpm 조건에서 14일간 진탕배양을 실시하여, 플레비아 브레비스포라 KUC9045(*Phlebia brevispora* KUC9045)(기탁번호: KACC93149P)를 배양하였다.

[0037] <비교예 1: 파네로카에테 크리소스포리움 KCTC6293(*Phanerochaete chrysosporium* KCTC6293)>

[0038] 상기 실시예 1에서, 플레비아 브레비스포라 KUC9045(*Phlebia brevispora* KUC9045)(기탁번호: KACC93149P) 대신에 파네로카에테 크리소스포리움 KCTC6293(*Phanerochaete chrysosporium* KCTC6293)을 접종하는 것을 제외하고, 상기 실시예 1과 동일하게 실시하였다.

[0039] <비교예 2: 비생물적 조절>

[0040] 상기 실시예 1에서, 다환방향족 탄화수소가 첨가된 액체배지에 플레비아 브레비스포라 KUC9045(*Phlebia brevispora* KUC9045)(기탁번호: KACC93149P)가 주입되지 않은 것을 제외하고, 상기 실시예 1과 동일하게 실시하였다.

[0041] <실험예 1: 다환방향족 탄화수소의 분해능력 평가>

[0042] 배양기간 종료 후, 실시예 1 및 비교예 1, 2의 삼각 플라스크 내의 내용물을 메틸렌 클로라이드(methylene chloride)에 진탕하여 분별하였다. 1회 100mL씩 3회에 걸쳐 분별기에 투입, 혼합하여 추출하였고, 추출한 용액을 분별 증류기를 이용해 증류하여 초기 배지 양의 1/10인 10mL까지 농축하였다.

[0043] 추출 후 농축된 용액은 기체 크로마토그래피-질량 분석기(Agilent 7890A)를 이용하여 분석하였으며, 칼럼은 DB-5MS(20m x 0.18 mm x 0.18um)를 사용하였다. 주입구의 온도는 100℃, 검출기의 온도는 325℃로 설정했으며, 유동 가스는 헬륨(1.73 ml/min)을 사용하였다. 승온 온도는 100℃에서 300℃까지는 10℃/min, 325℃까지는 20℃/min 으로 설정했으며, 325℃에서 10분간 유지시켰다.

[0044] 다환방향족 탄화수소를 첨가후 7일과 14일에서의 분해능력을 비교한 결과, 하기의 표 2 및 도 1에 나타낸 바와 같이, 실시예 1의 플레비아 브레비스포라 KUC9045(*Phlebia brevispora* KUC9045)(기탁번호: KACC93149P)는 사용된 4가지의 다환방향족 탄화수소에 대하여, 비교예 1의 파네로카에테 크리소스포리움 KCTC6293(*Phanerochaete chrysosporium* KCTC6293)보다 통계적으로 유의성이 있는 높은 수치의 분해율을 나타내었다. 또한 2일마다 플레

비아 브레비스포라 KUC9045(*Phlebia brevispora* KUC9045)(기탁번호: KACC93149P)의 다환방향족 탄화수소의 분해를 분석한 결과로, 2일과 12일에서 빠른 분해율을 나타내며 다환방향족 탄화수소를 제거하였다. 이때, 상기 분해율은 초기농도인 50mg/l가 추출 된 후 10배로 농축된 농도인 500mg/l 대비하여 분해된 농도를 정량 분석하여 퍼센트로 나타내었다.

표 2

[0045]

	다환방향족 탄화수소의 분해율(%)			
	페난트렌	안트라센	플로란센	피렌
실시에 1	66.3	67.4	61.6	63.3
비교예 1	35.7	43.1	28.6	32.6
비교예 2	22.4	17.8	25.1	14.5

[0046]

<실험예 2: 리그닌 분해효소의 활성 평가>

[0047]

상기 실시예 1의 배양 중 매일 배양액 1mL을 취해 0.45 μ m 시린지 필터(syringe filter)를 사용해 균사제거 후 락카아제(laccase, Lac) 및 망간 퍼옥시데이즈(manganese dependant peroxidase, MnP) 활성을 평가하였다. 락카아제의활성은 0.1 M 아세트산 나트륨(sodium acetate, pH 4.5) 완충액에 5mM 2,2'-아지노-비스(3-에틸벤조티아졸린-6-설폰산 (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid, ABTS) 와 시료를 첨가하여 1분간 반응시키면서 420 nm에서 흡광도 변화를 측정하여 평가하였으며, 1분당 1 μ mol의 ABTS를 산화시키는 효소의 양을 1 유닛(unit)으로 하였다.

[0048]

망간 퍼옥시데이즈의 효소 활성도는 0.5M 말론산 나트륨(sodium malonate, pH 4.5) 완충액에 1 mM 2,6-디메틸페놀(2,6-dimethylphenol, DMP), 1 mM 황산망간(MnSO₄) 및 시료를 혼합한 후 1mM 과산화수소(hydrogen peroxide)를 첨가하여 1분간 반응시키면서 469nm에서 흡광도 변화를 측정하였다. MnP의 효소 활성 단위는 분당 1 μ mol의 Mn²⁺을 산화시키는 효소의 양을 1 유닛(unit)으로 하였다.

[0049]

도 2에 나타난 바와 같이, 다환방향족 탄화수소의 분해에 따른 락카아제와 망간 퍼옥시데이즈의 생산은 9일째 상기 두 효소 모두 가장 높은 수치를 나타내었으며, 망간 퍼옥시데이즈는 락카아제와 달리 배양 후 14일까지 생산량이 점점 증가하는 추세를 보였다. 이는 14일째에 다환방향족 탄화수소 잔여량이 존재함에 따라 다환방향족 탄화수소의 분해가 완전히 이루어 질 때 까지 분해에 관여하는 효소의 생산량이 증가한다고 판단할 수 있다.

[0050]

따라서 효소생산과 분해는 직접적인 관련성이 있음을 확인할 수 있으며, 효소 생산량의 증가로 볼 때, 14일 이후 완전한 다환방향족 탄화수소의 분해를 기대할 수 있다.

수탁번호

[0051]

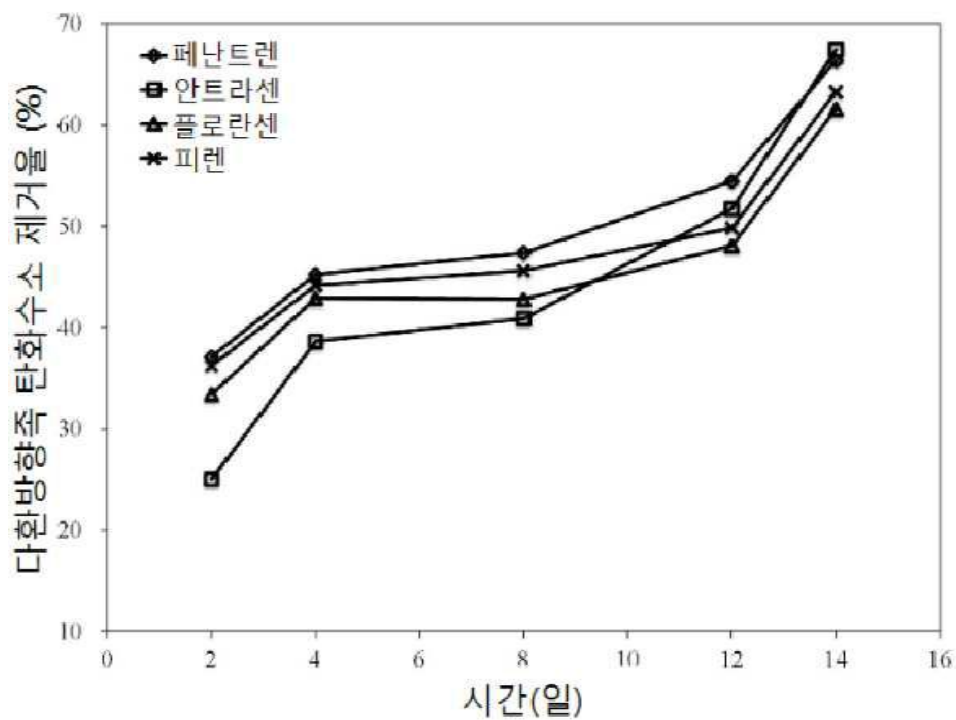
기탁기관명 : 국립농업과학원 농업유전자원센터

수탁번호 : KACC93149P

수탁일자 : 20120314

도면

도면1



도면2

