

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0010605 (43) 공개일자 2014년01월27일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 1/14 (2006.01) B09C 1/10 (2006.01) (21) 출원번호 10-2012-0077051 (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) 양윤희 경상남도 진주시 가좌길29번길 63 (가좌동 미생물학과) (뒷면에 계속) (74) 대리인 김남식, 양기혁, 한윤호, 이인행
전체 청구항 수 : 총 1 항		
(54) 발명의 명칭 다환 방향족 탄화수소를 분해하는 Naematoloma fascicular IUM 1277 균주		

(57) 요약

본 발명은 생물학적 PAH 제거 방법을 제공하기 위하여, *Naematoloma fasciculare* IUM 1277 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 함유하는 다환 방향족 탄화수소 제거용 조성물을 제공한다.

(72) 발명자

김신일

경상남도 진주시 가좌길29번길 63 (가좌동 미생물학과)

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

Naematoloma fasciculare IUM 1277 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 함유하는 다환 방향족 탄화수소 제거용 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 난분해성 다환 방향족 탄화수소 분해능이 있는 자생 생물자원에 관한 것으로서, 더 상세하게는 다환 방향족 탄화수소를 분해하는 *Naematoloma fasciculare* IUM 1277 균주에 관한 것이다.

배경기술

[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(Benzene, 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 hydrocarbon)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 bioremediation에서 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.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 포함하여 여러 문제점들을 해결하기 위한 것으로서, *Naematoloma fasciculare* IUM 1277 균주를 이용한 다환 방향족 탄화수소 제거용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다. 그러나 이러한 과제는 예시적인 것으로, 이에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

과제의 해결 수단

[0005] 본 발명의 일 관점에 따르면, *Naematoloma fasciculare* IUM 1277 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 함유하는 다환 방향족 탄화수소 제거용 조성물이 제공된다.

[0006] 상기 균주는 본 발명자에 의하여 합성염료에 대한 분해능이 최초로 입증된 *Naematoloma fasciculare* IUM 1277 균주로, 인천대학교 야생버섯균주은행으로부터 자유롭게 분양받을 수 있는 공지균주이다.

[0007] 상기 다환 방향족 탄화수소는 나프탈렌(naphthalene), 안트라센(anthracene), 페난트렌(phenanthrene), 파이렌(pyrene) 등일 수 있다.

[0008] 본 발명의 다른 관점에 따르면, *Naematoloma fasciculare* IUM 1277 균주 또는 이의 배양액을 다환 방향족 탄화수소로 오염된 지역에 살포하는 단계를 포함하는 다환 방향족 탄화수소의 제거방법이 제공된다.

[0009] 상기 제거방법에 있어서, 다환 방향족 탄화수소로 오염된 지역은 유류 수송 과정이나 저장시설로부터 유출된 PAH로 오염된 토양, 퇴적물, 지하수, 해양, 해안가 등일 수 있으며, 상기 다환 방향족 탄화수소는 나프탈렌(naphthalene), 안트라센(anthracene), 페난트렌(phenanthrene), 파이렌(pyrene) 등일 수 있다.

[0010] 본 발명의 또 다른 관점에 따르면, *Naematoloma fasciculare* IUM 1277 균주를 배양하고 있는 배양배지에 다환 방향족 탄화수소로 오염된 폐수를 첨가하는 단계를 포함하는 폐수로부터 다환 방향족 탄화수소의 제거방법이 제공된다.

[0011] 상기 다환 방향족 탄화수소는 나프탈렌(naphthalene), 안트라센(anthracene), 페난트렌(phenanthrene), 파이렌(pyrene) 등일 수 있다.

발명의 효과

[0012] 상기한 바와 같이 이루어진 본 발명의 일 실시예에 따르면, 다환 방향족 탄화수소 화합물에 대하여 분해능을 가지는, *Naematoloma fasciculare* IUM 1277 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 함유하는 다환 방향족 탄화수소 제거용 조성물을 구현할 수 있다. 물론 이러한 효과에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 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.

[0014] 실시예 1: *Naematoloma fasciculare* IUM 1277 균주의 배양

[0015] *Naematoloma fasciculare* 균주는 인천대학교 야생버섯균주은행으로부터 분양받았으며, 구체적으로 IUM 0136, 1277 및 4075 스트레인을 분양받았다. 상기 균주는 PDA(Potato Dextrose Agar) 배지에서 배양하였다. 상기 PDA 배지는 포테이토(potato) 약 200g과 박토텍스트로스(bacto dextrose) 약 20g 및 박토아가(bacto agar) 약 15g를 포함하는 배지이다. *Naematoloma fasciculare* 균주를 PDA 배지에서 25℃의 배양온도에서 7일 이상 배양하였다.

[0016] 실험예 1: PAH 분해능 분석

[0017] 디젤오일은 5%이상의 PAH를 함유하고 있는 주요 오염원으로, 디젤오일 내에 포함된 PAH를 분해할 수 있는지 확인하기 위하여, 3% 디젤 존재 하에서 *Naematoloma fasciculare* 균주를 배양하였다.

[0018] 구체적으로, 상기 실시예 1에서 배양된 3가지 스트레인의 *Naematoloma fasciculare* 균주를 3% 디젤오일이 함유된 PD broth에서 1주일간 배양하였다. 배양이 끝난 후, 배양액을 추출하여 가스 크로마토그래피 분석을 실시하였다(Cajthmal TM, et al., J. Chromatogr. A., 974(1-2):213-22., 2002). HPLC의 경우 방향족 탄화수소(aromatic hydrocarbon)를 분석할 수는 있었으나, 디젤 오일 내 75%를 차지하는 지방족 탄화수소(aliphatic hydrocarbon)의 존재로 인하여, 컬럼 분석에 어려움이 있었으므로, 가스 크로마토그래피로 분석을 수행하였다.

[0019] 가스 크로마토그래피 분석 결과 우선 디젤오일에는 다양한 크기의 지방족 탄화수소(aliphatic hydrocarbon)이 주성분으로 주요 피크로 나타났으며, 버섯균은 지방족 탄화수소(aliphatic hydrocarbon) 분해능은 거의 없는 것으로 나타났다. 반면, PAH를 포함한 방향족 탄화수소(aromatic hydrocarbon)는 minor한 성분으로 가스 크로마토그래피 상에서 정량적으로 분석하는 것이 매우 힘들다는 것을 확인하였다.

[0020] 이에 따라, *Naematoloma fasciculare* 균주의 PAH 분해능을 직접적으로 확인하기 위하여, 디젤 오일 대신 PAH 분해능 조사의 모델 시료인 나프탈렌(naphthalene)과 안트라센(anthracene)을 각각 50 ppm을 포함하는 PD broth에서 1주일간 배양하였다. 배양이 끝난 후, 배양액을 추출하여 가스 크로마토그래피 분석을 실시하였다(Cajthmal TM, et al., J. Chromatogr. A., 974(1-2):213-22., 2002).

[0021] 그 결과, 하기 표 1에 기재된 바와 같이 *Naematoloma fasciculare* 균주 스트레인에 따라 PAH 분해능에 차이가 있었으며, IUM 1277 균주의 PAH 분해능이 가장 우수함을 확인할 수 있었다(표 1 참조). 이는 *Naematoloma fasciculare* IUM 1277 균주의 PAH 제거능력을 최초로 입증하는 것이다. 따라서, 본 발명의 일 실시예에 따른 *Naematoloma fasciculare* IUM 1277 균주를 PAH 제거용 미생물 제제 또는 이를 PAH로 오염된 토양, 퇴적물, 지하수, 해양, 해안가에 살포하는 PAH 제거 방법으로 활용할 수 있을 것이다.

표 1

IUM	학명	배지내 잔여 PAH(%)		버섯명
		naphthalene	anthracene	

0136	<i>Naematoloma fasciculare</i>	0.0	71.6	노란다발버섯
1277	<i>Naematomola fasciculare</i>	0.0	7.6	노란다발버섯
4075	<i>Naematomola fasciculare</i>	0.0	15.5	노란다발버섯

[0023] <제제예 1> 미생물 제제의 제조

[0024] <1-1> 수화제의 제조

[0025] 본 발명자들은 상기 실험예 1에서 PAH 제거능을 확인한 *Naematomola fasciculare* IUM 1277 균주 또는 이의 배양액을 이용하여 PAH 제거용 미생물 제제를 제조하기 위해, 안정적인 제제화를 목적으로 분상으로서 물에 희석하였을 때 수화되는 수화제를 제조하였다. 구체적으로, 수화제는 고체배지를 가운, 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.

[0026] <1-2> 입제의 제조

[0027] 본 발명자들은 *Naematomola fasciculare* IUM 1277 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 봉해제를 균주의 포자 50%, 폴리카르복실레이트 3%, 소듐리노설포네이트 3%, 소듐 다이알킬 설프로석시네이트 1%, 전분 10%, 벤토나이트 20%, 탈크 13%로 구성으로 혼합하여 혼합분의 전체 분체량의 35% 정도로 가수하고 반죽을 하였다.

[0028] 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 분체를 제거한 후 입제를 제조하였다.

[0029] <1-3> 캡슐화 제형의 제조

[0030] 본 발명자들은 *Naematomola fasciculare* IUM 1277 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%를 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 *Naematomola fasciculare* IUM 1277 균주를 넣고 완전히 섞어 미생물 살균 캡슐화 제형을 제조하였다.

[0031] 본 발명은 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.