



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0081621
(43) 공개일자 2024년06월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) C02F 3/34 (2017.01)
C12R 1/01 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/205 (2021.05)
C02F 3/341 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0164369
(22) 출원일자 2022년11월30일
심사청구일자 2022년11월30일

(71) 출원인
대한민국(환경부 국립생물자원관장)
인천 서구 환경로 42, 종합환경연구단지 국립생물
자원관 (경서동)
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암
동5가)
주식회사 씨디아이
경기도 화성시 마도면 청원산단8길 129
(72) 발명자
허문석
인천광역시 서구 환경로 34번길 6, 동아아파트
104동 203호
이승기
인천광역시 서구 환경로 42 국립환경연구원 소재
연구동 405호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
안창우

전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 잉여슬러지의 생분해 활성을 갖는 균주 및 이의 용도

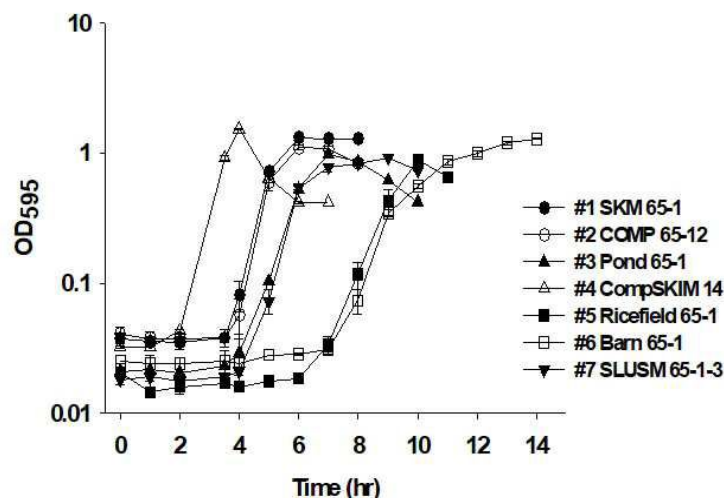
(57) 요약

본 발명은 잉여슬러지의 생분해를 활성을 갖는 파라지오바실러스 퇴비 균주, 게오바실러스 씨모데니트리피칸스 균주, 우레이바실러스 수위넨시스 균주 내지 우레이바실러스 씨모필루스 균주에서 선택되는 하나 이상의 균주, 이를 유효성분으로 포함하는 잉여슬러지의 생분해용 조성물, 그리고 잉여슬러지의 생분해 방법을 제공한다.

본 발명의 4종 균주 또는 이들의 복합균주는 활성슬러지의 전처리(65℃) 과정에 준하는 고온에서 생존이 가능하고, 단백질 분해효소의 분비 등을 통해 슬러지의 구성요소인 사균 세포벽 분해에 효과적이며, 농축슬러지의 용존 유기물을 효과적으로 감소시켜 잉여슬러지 처리효율을 증대시키는 장점이 있다.

또한, 본 발명의 4종 균주 또는 이들의 복합균주는 메탄가스의 생성을 증가시켜 하수처리장의 에너지 자립화에 기여할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 1/20 (2021.05)

C12R 2001/01 (2021.05)

(72) 발명자

정유정

인천광역시 서구 승학로 534, 301호

박희등

경기도 성남시 분당구 정자일로 27, 코오롱더프라
우아파트동 1402호 (금곡동,
코오롱더프라우아파트)

이상훈

서울특별시 강동구 천호대로 1240 프라자아파트 4
동 803호

김나경

서울특별시 성북구 고려대로16길 6 302호

최기승

서울특별시 영등포구 여의대방로 25 보라매 경남아
파트 102동 1902호

명세서

청구범위

청구항 1

잉여슬러지 생분해용 파라지오바실러스 퇴비(*Parageobacillus toebii*) NIBRBAC000509403 균주(수탁번호: KACC 92470P).

청구항 2

잉여슬러지 생분해용 우레이바실러스 수위넨시스(*Ureibacillus suwonensis*) NIBRBAC000509263 균주(수탁번호: KACC 92467P).

청구항 3

잉여슬러지 생분해용 게오바실러스 써모데니트리피칸스(*Geobacillus thermodenitrificans*) NIBRBAC000509282 균주(수탁번호: KACC 92468P).

청구항 4

잉여슬러지 생분해용 우레이바실러스 써모필루스(*Ureibacillus thermophilus*) NIBRBAC000509402 균주(수탁번호: KACC 92469P).

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 균주, 이들의 복합균주, 또는 그 배양액을 포함하는 잉여슬러지 생분해용 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 복합균주는 파라지오바실러스 퇴비(*Parageobacillus toebii*) NIBRBAC000509403 균주(수탁번호: KACC 92470P) 및 우레이바실러스 수위넨시스(*Ureibacillus suwonensis*) NIBRBAC000509263 균주(수탁번호: KACC 92467P)의 2종 복합균주인 것을 특징으로 하는 잉여슬러지 생분해용 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 복합균주는 게오바실러스 써모데니트리피칸스(*Geobacillus thermodenitrificans*) NIBRBAC000509282 균주(수탁번호: KACC 92468P) 및 우레이바실러스 써모필루스(*Ureibacillus thermophilus*) NIBRBAC000509402 균주(수탁번호: KACC 92469P)를 더 포함하는 4종 복합균주인 것을 특징으로 하는 잉여슬러지 생분해용 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 조성물은 잉여슬러지에서 생산되는 메탄가스 수율을 향상시키는 것을 특징으로 하는 잉여슬러지 생분해용 조성물.

청구항 9

잉여슬러지에 제5항의 조성물을 처리하여 잉여슬러지의 생분해를 촉진하는 방법.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 잉여슬러지의 생분해 활성을 갖는 4종 균주, 이를 포함하는 잉여슬러지의 생분해용 조성물, 그리고 잉여슬러지의 생분해 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 산업 폐수, 생활 하수, 폐기물 등의 유해물질에 대한 생물학적 처리와 관련된 미생물의 종류는 수천 종 이상에 이르는 것으로 추정되나, 유해물질 저감은 주로 물리·화학적 방법이 이용되고 있다. 환경문제의 대처를 위한 친환경·생물학적 방법은 유해물질의 발생 또는 사용으로 인한 비용, 위험성 등을 줄이는 수단으로 개발 요구가 증가하고 있어 환경 미생물의 체계적 탐색과 응용 연구를 통해 국가생물자원을 친환경 생물 소재로 개발할 필요가 있다.

[0004] 한편, 일반적으로 하수처리는 생물학적 원리를 채택한 활성슬러지 공정이나, 활성슬러지 공정을 일부 개량한 변형 공정으로 이루어진다. 이러한 이유는 물리화학적 공정과 비교하여 활성슬러지 공정이 상대적으로 적은 에너지와 운영비가 소요되기 때문이며, 아울러 매우 깨끗한 처리 수를 안정적으로 얻을 수 있기 때문이다.

[0005] 그러나, 활성슬러지 공정은 하수처리 과정에서 많은 양의 잉여슬러지('2차슬러지'라고도 함)를 발생시키는데, 잉여슬러지는 1차 슬러지(유입하수 중 가라앉은 물질)와 합쳐지고, 탈수과정을 거쳐 건조되어 매립되거나 소각된 후 처분되게 된다. 따라서, 잉여슬러지의 처리 중 건조 혹은 소각 공정에서 다량의 열에너지를 요구하게 되므로, 많게는 하수처리장 전체 소요 에너지의 절반 정도를 차지하게 된다.

[0006] 이러한 이유로 대부분 하수처리장은 발생된 슬러지(1차슬러지와 잉여슬러지) 감량을 위해 혐기성 소화조를 설치하여 운영한다. '혐기성 소화'는 산소가 제공되지 않은 상태에서 미생물에 의한 유기물의 분해과정을 의미하며, 이러한 분해과정을 거치게 되면 상당량의 슬러지가 감소하고, 건조 혹은 소각되어야 하는 슬러지 부피를 줄일 수 있는 장점이 있다. 아울러 혐기성 소화 과정에서 메탄이 주성분인 바이오가스가 발생하게 되는데, 이렇게 발생하는 바이오가스는 보일러 또는 가스엔진의 연료로 사용되어 온수 혹은 전기를 생산하는데 이용될 수 있다.

[0007] 현 기술 수준에서 혐기성 소화조를 이용한 슬러지 소화 효율은 50%에 미치지 못하는 경우가 일반적인데, 이는 잉여슬러지의 대부분이 미생물 세포들로 구성되어 분해가 어렵기 때문이다. 슬러지에 존재하는 대부분의 미생물 세포들은 세포막 바깥쪽으로 두꺼운 세포벽이 둘러싸고 있다. 세포벽은 다당류로 이루어진 가닥들과 이 가닥들을 교차하는 펩타이드들로 구성된 메쉬(mesh) 형태의 매우 견고한 구조물이며, 혐기성 소화 과정에서 쉽게 분해되지 않는다. 따라서, 미생물 세포벽의 분해 저해는 혐기성 소화의 효율을 떨어뜨리는 주요한 원인이다.

[0008] 한편, 슬러지 소화의 효율을 증진하기 위해 전처리가 시행되기도 한다. 전처리는 물리적, 화학적, 생물학적 방법으로 잉여슬러지를 용해시키는 과정인데, 이를 통해 크게는 슬러지의 소화 효율이 2~3배 정도 향상되기도 한다. 물리적 전처리로는 볼 밀, 초음파, 고온/고압처리 공정 등이 있고, 화학적 처리는 오존, 알칼리 처리 공정 등이 있으며, 생물학적 처리는 효소주입 공정 등이 있다. 다만, 물리적 처리방법은 화학적/생물학적 전처리 방법에 비교하여 시설비 투자가 과도한 단점이 있다. 또한, 화학적 방법은 물리학적/생물학적 방법과 비교하여 운영비가 더 많이 소요된다는 단점이 있다.

[0009] 한편, 생물학적 방법은 잉여슬러지 처리효율이 높고, 시설비가 크게 소요되지 않는 측면에서 장점이 있지만, 대부분 고가의 단백질 또는 다당류 분해효소에 기반을 두는 방식으로 운영비가 많이 소요되는 단점이 있다. 이외에도 슬러지의 고온/고압 처리방법이 국내에서는 많은 주목을 받고 있으나, 고가의 시설비와 운영비, 그리고 복잡한 시설운영 과정 등의 문제로 보급이 저조한 실정이다.

[0010] 따라서, 현장에서 사용할 수 있도록 시설비, 운영비, 시설운영의 용이성 등의 장점이 있는 새로운 활성슬러지 처리 공정이 요구되는 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0012] (특허문헌 0001) (0001) 특허등록 제10-1176149호(2012.08.16.), 잉여활성슬러지로부터 유래한 생물응집체를 이용하는 미세조류 회수방법 및 그 장치

(특허문헌 0002) (0002) 특허공개 제10-2002-0057466호(2002.07.11.), 광합성 미생물을 이용한 하폐수 처리방법 및 그의 처리장치

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0013] 따라서, 본 발명의 주된 목적은 잉여슬러지의 처리 효율을 증진할 수 있는 잉여슬러지 생분해용 파라지오바실러스 퇴비(*Parageobacillus toebii*), 게오바실러스 써모데니트리피칸스(*Geobacillus thermodenitrificans*), 우레이바실러스 수위넨시스(*Ureibacillus suwonensis*), 및 우레이바실러스 써모필루스(*Ureibacillus thermophilus*)의 4종 균주 또는 이들의 복합 균주를 제공하는 데 있다.
- [0014] 본 발명의 다른 목적은 상기 4종 균주 또는 이들의 복합균주와 그 배양액을 포함하는 잉여슬러지 생분해용 조성물과 이를 이용한 잉여슬러지의 생분해를 촉진하는 방법을 제공하는데 있다.
- [0015] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0017] 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 잉여슬러지 생분해용 파라지오바실러스 퇴비(*Parageobacillus toebii*) NIBRBAC000509403 균주(수탁번호: KACC 92470P)를 제공한다.
- [0018] 또한, 본 발명은 잉여슬러지 생분해용 우레이바실러스 수위넨시스(*Ureibacillus suwonensis*) NIBRBAC000509263 균주(수탁번호: KACC 92467P)를 제공한다.
- [0019] 또한, 본 발명은 잉여슬러지 생분해용 게오바실러스 써모데니트리피칸스(*Geobacillus thermodenitrificans*) NIBRBAC000509282 균주(수탁번호: KACC 92468P)를 제공한다.
- [0020] 또한, 본 발명은 잉여슬러지 생분해용 우레이바실러스 써모필루스(*Ureibacillus thermophilus*) NIBRBAC000509402 균주(수탁번호: KACC 92469P)를 제공한다.
- [0021] 본 발명자들은 종래 생물학적 처리 방식에 투입되는 고가의 단백질 또는 다당류 분해효소를 대체할 수 있도록, 활성슬러지의 전처리(65℃) 과정에서 생존 가능한 고온내성을 갖는 동시에 활성슬러지를 효과적으로 분해할 수 있는 분해 활성이 있는 미생물을 발굴하기 위해 예의 연구노력한 결과, 하수슬러지 및 퇴비 등 13개 지점의 오염환경으로부터 분리 동정된 4종 균주가 활성슬러지의 전처리(65℃) 과정에 준하는 고온에서 생존 가능하고, 단백질 분해효소의 분비 등을 통해 슬러지의 구성요소인 사균 세포벽의 분해에 효과적이며, 농축슬러지의 용존 유기물을 효과적으로 감소시켜 잉여슬러지 처리효율을 높이는 데 크게 기여하는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0022] 본 발명의 바람직한 실시예에서는 다양한 시료에서 분리된 콜로니(colony)를 순수분리하여 스킴 밀크(skim milk) 고체배지에서 분해 활성을 보이는 균주를 선별하였고, 선별된 고온내성 원핵생물의 생장곡선 측정결과, 상기 4종 균주 모두가 초기 2시간에서 최장 7시간의 유도기를 갖고, 2~4 시간 내에 급격하게 성장하는 것을 확인한 바 있다([도 1] 참조).
- [0023] 또한, Protease Assay Kit를 통해 선별된 7개 균주별 단백질 분해효소 활성도 정량분석 결과, COMP 65-12(#2) 균주가 12.2%의 활성을 나타냈고, SKM 65-1(#1) 균주가 9.7%의 활성을 나타내었으며, COMP SKIM 14(#4) 균주가 6.6%의 활성을 나타내는 등 7종 균주 모두 단백질 분해효소 활성을 것으로 측정되었다([도 4] 참조).
- [0024] 다만, 상기 3종 균주 이외에 다른 균주에서는 다소 낮은 활성이 측정되었는데, 이는 Protease Assay Kit의 최적 실험 온도가 37℃로, 기질로 주입된 카세인(casein) 성분이 고온에서 구조가 변성되어 고온내성 세균의 단백질 분해효소와 결합하지 못하고 분해 기전이 원활하게 수행되지 못하였기 때문으로 분석되었다. 이를 보완하고 실제 고온에서의 슬러지 분해 효과를 관찰하기 위해 하수처리시설에서 확보한 잉여슬러지를 대상으로 7종 균주를 주입하여 65℃ 조건에서 tCOD를 sCOD로 전환하는 활성을 측정하였다. 그 결과, Pond 65-2(#3) 균주를 주입한 실험군을 제외하고, 나머지 6종 균주를 주입한 실험군에서 무처리 음성대조군에 비해 높은 sCOD 전환율이 개선됨을 확인하였다(미도시).

- [0025] 본 발명자들은 상기 COMP 65-12(#2) 균주를 파라지오바실러스 퇴비(*Parageobacillus toebii*) NIBRBAC000509403 균주로 명명하고, 이를 2022년 10월 31일자로 농촌진흥청 국립농업과학원 미생물은행(KACC)에 기탁하여 수탁번호 KACC 92470P를 부여받았다. 본 발명에서 파라지오바실러스 퇴비(*Parageobacillus toebii*) 균주(수탁번호: KACC 92470P), NIBRBAC000509403 균주 및 COMP 65-12(#2) 균주는 동일한 의미로 사용된다.
- [0026] 또한, 본 발명자들은 상기 SKM 65-1(#1) 균주를 우레이바실러스 수위넨시스(*Ureibacillus suwonensis*) NIBRBAC000509263 균주로 명명하고, 이를 2022년 10월 31일자로 농촌진흥청 국립농업과학원 미생물은행(KACC)에 기탁하여 수탁번호 KACC 92467P를 부여받았다. 본 발명에서 우레이바실러스 수위넨시스(*Ureibacillus suwonensis*)(수탁번호: KACC 92467P), NIBRBAC000509263 균주 및 SKM 65-1(#1) 균주는 동일한 의미로 사용된다.
- [0027] 또한, 본 발명자들은 상기 CompSKIM 14(#4) 균주를 게오바실러스 썬모테니트리피칸스(*Geobacillus thermodenitrificans*) NIBRBAC000509282 균주로 명명하고, 이를 2022년 10월 31일자로 농촌진흥청 국립농업과학원 미생물은행(KACC)에 기탁하여 수탁번호 KACC 92468P를 부여받았다. 본 발명에서 게오바실러스 썬모테니트리피칸스(*Geobacillus thermodenitrificans*) 균주(수탁번호: KACC 92468P), NIBRBAC000509282 균주 및 CompSKIM 14(#4) 균주는 동일한 의미로 사용된다.
- [0028] 또한, 본 발명자들은 상기 SKM 65-1(#1) 균주를 우레이바실러스 썬모필루스(*Ureibacillus thermophilus*) NIBRBAC000509402 균주로 명명하고, 이를 2022년 10월 31일자로 농촌진흥청 국립농업과학원 미생물은행(KACC)에 기탁하여 수탁번호 KACC 92469P를 부여받았다. 본 발명에서 우레이바실러스 썬모필루스(*Ureibacillus thermophilus*) 균주(수탁번호: KACC 92469P), NIBRBAC000509402 균주 및 SKM 65-1(#1) 균주는 동일한 의미로 사용된다.
- [0029] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 파라지오바실러스 퇴비(*Parageobacillus toebii*) NIBRBAC000509403 균주(수탁번호: KACC 92470P), 게오바실러스 썬모테니트리피칸스(*Geobacillus thermodenitrificans*) NIBRBAC000509282 균주(수탁번호: KACC 92468P), 우레이바실러스 수위넨시스(*Ureibacillus suwonensis*) NIBRBAC000509263 균주(수탁번호: KACC 92467P) 및 우레이바실러스 썬모필루스(*Ureibacillus thermophilus*) NIBRBAC000509402 균주(수탁번호: KACC 92469P)로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나의 균주, 이들의 복합균주, 또는 그 배양액을 포함하는 잉여슬러지 생분해용 조성물을 제공한다.
- [0030] 진술한 바와 같이 본 발명의 상기 4종 균주는 각각의 단일균주로 사용되어도 충분하게 잉여슬러지의 sCOD 전환율을 개선시켜 생분해를 촉진하는 활성이 있으나, 이들 4종 균주를 조합하여 복합균주로 사용하는 경우에는 잉여슬러지의 생분해를 더욱 촉진하는 시너지 활성을 나타내는 것을 특징으로 한다.
- [0031] 본 발명의 바람직한 실시예에서는 파라지오바실러스 퇴비(*Parageobacillus toebii*) NIBRBAC000509403 균주(수탁번호: KACC 92470P) 및 우레이바실러스 수위넨시스(*Ureibacillus suwonensis*) NIBRBAC000509263 균주(수탁번호: KACC 92467P)의 2종 복합균주를 주입한 실험군은 미주입 실험군과 비교하여 약 154%(1,841.4mg/L) 상승한 sCOD 농도가 관찰되어 잉여슬러지의 생분해를 촉진하는 우수한 활성이 있음을 확인한 바 있다(도 6 참조).
- [0032] 또한, 본 발명의 바람직한 실시예에서는 파라지오바실러스 퇴비(*Parageobacillus toebii*) NIBRBAC000509403 균주(수탁번호: KACC 92470P), 게오바실러스 썬모테니트리피칸스(*Geobacillus thermodenitrificans*) NIBRBAC000509282 균주(수탁번호: KACC 92468P), 우레이바실러스 수위넨시스(*Ureibacillus suwonensis*) NIBRBAC000509263 균주(수탁번호: KACC 92467P) 및 우레이바실러스 썬모필루스(*Ureibacillus thermophilus*) NIBRBAC000509402 균주(수탁번호: KACC 92469P)의 4종 복합균주를 주입한 실험군은 단일 균주 중 가장 높은 전환율을 나타내는 파라지오바실러스 퇴비(*Parageobacillus toebii*) NIBRBAC000509403 단일균주 주입 실험군과 비교하여 2.5배 정도 상승한 sCOD 농도가 관찰되어 잉여슬러지의 생분해를 촉진하는 우수한 시너지 활성이 있음을 확인한 바 있다(도 9 참조).
- [0033] 본 발명의 잉여슬러지 생분해용 조성물에서, 상기 4종 복합균주는 잉여슬러지에서 생산되는 메탄가스 수율을 향상시키는 것을 특징으로 한다. 본 발명의 바람직한 실시예에서는 본 발명의 4종 복합균주를 활용하여 슬러지를 가수분해하는 경우에 생슬러지(상온) 또는 생슬러지(65℃) 조건에 비해 각각 38.5% 또는 93.3% 개선된 메탄생산 수율의 향상이 가능함을 확인한 바 있다(도 10 참조).
- [0034] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 혐기성 소화조의 잉여슬러지에 파라지오바실러스 퇴비(*Parageobacillus toebii*) NIBRBAC000509403 균주(수탁번호: KACC 92470P), 게오바실러스 썬모테니트리피칸스(*Geobacillus thermodenitrificans*) NIBRBAC000509282 균주(수탁번호: KACC 92468P), 우레이바실러스 수위넨시스

스(*Ureibacillus suwonensis*) NIBRBAC000509263 균주(수탁번호: KACC 92467P) 내지 우레이바실러스 썬모필루스(*Ureibacillus thermophilus*) NIBRBAC000509402 균주(수탁번호: KACC 92469P) 중 어느 하나의 균주, 이들의 복합균주, 또는 그 배양액을 포함하는 잉여슬러지 생분해용 조성물을 처리하여 잉여슬러지의 생분해를 촉진하는 방법을 제공한다. 전술한 바와 같이 본 발명의 상기 잉여슬러지 생분해용 균주는 활성슬러지의 전처리(65℃) 과정에 준하는 고온에서 생존이 가능하고, 단백질 분해효소의 분비 등을 통해 슬러지의 구성요소인 사균 세포벽 분해에 효과적이며, 농축슬러지의 용존 유기물을 효과적으로 감소시켜 잉여슬러지 처리효율을 높이는데 사용될 수 있다. 상기 파라지오바실러스 퇴비(*Parageobacillus toebii*) NIBRBAC000509403 균주(수탁번호: KACC 92470P), 게오바실러스 썬모테니트리피칸스(*Geobacillus thermodenitrificans*) NIBRBAC000509282 균주(수탁번호: KACC 92468P), 우레이바실러스 수위넨시스(*Ureibacillus suwonensis*) NIBRBAC000509263 균주(수탁번호: KACC 92467P) 및 우레이바실러스 썬모필루스(*Ureibacillus thermophilus*) NIBRBAC000509402 균주(수탁번호: KACC 92469P)와 이들의 잉여슬러지 생분해 특성은 앞에서 상세히 설명한바, 명세서가 지나치게 복잡하게 되는 것을 피하기 위해 여기서는 생략하도록 한다.

발명의 효과

[0036]

본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0037]

(a) 본 발명은 잉여슬러지의 생분해를 활성을 갖는 파라지오바실러스 퇴비 균주, 게오바실러스 썬모테니트리피칸스 균주, 우레이바실러스 수위넨시스 균주 내지 우레이바실러스 썬모필루스 균주에서 선택되는 하나 이상의 균주, 이를 유효성분으로 포함하는 잉여슬러지의 생분해용 조성물, 그리고 잉여슬러지의 생분해 방법을 제공한다.

[0038]

(b) 본 발명의 4종 균주 또는 이들의 복합균주는 활성슬러지의 전처리(65℃) 과정에 준하는 고온에서 생존이 가능하고, 단백질 분해효소의 분비 등을 통해 슬러지의 구성요소인 사균 세포벽 분해에 효과적이며, 농축슬러지의 용존 유기물을 효과적으로 감소시켜 잉여슬러지 처리효율을 증대시키는 장점이 있다.

[0039]

(c) 또한, 본 발명의 4종 균주 또는 이들의 복합균주는 메탄가스의 생성을 증가시켜 하수처리장의 에너지 자립화에 기여할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0041]

도 1은 선별된 7종 고온내성 균주의 생장곡선을 측정한 그래프이다.

도 2는 선별된 7종 균주를 스킴 밀크(skim milk) 고체배지에 접종하고, 65℃에서 0/N 배양한 후, 촬영한 사진이다.

도 3은 선별된 7종 균주를 Sierra Lipolytic Agar 고체배지에 접종하고, 65℃에서 0/N 배양한 후, 촬영한 사진이다.

도 4는 Protease Assay Kit를 이용하여 선별된 7종 균주의 단백질 분해효소 활성을 측정하여 정리한 그래프이다.

도 5는 잉여슬러지에 SKM 65-1(#1) 균주와 COMP 65-12(#2) 균주를 주입한 후, 잉여슬러지의 상태변화를 모니터링한 결과 사진이다.

도 6은 고온내성 단백질 분해효소 생산 2종 균주[SKM 65-1(#1) 및 COMP 65-12(#2)]를 잉여슬러지에 주입하고, sCOD 전환율을 정리한 그래프이다.

도 7은 하수처리시설로부터 채취된 농축슬러지 시료의 성장 분석 결과이다.

도 8은 하수처리시설로부터 채취된 농축슬러지 시료에 본 발명의 4종 복합균주를 처리하고, 슬러지가수분해 sCODcr 전환율 값을 정리한 그래프이다.

도 9는 COMP 65-12(#2) 단일 균주 처리군과 4종 균주 처리군의 sCOD 전환율을 비교하여 정리한 그래프이다.

도 10은 4종 복합균주를 활용하여 슬러지를 가수분해하는 경우에 생산되는 메탄 가스의 생성량을 측정한 그래프

이다.

도 11은 파라지오바실러스 퇴비(*Parageobacillus toebii*) NIBRBAC000509403 균주(수탁번호: KACC 92470P)에 대한 계통수를 도시한 그림이다.

도 12는 게오바실러스 써모데니트리피칸스(*Geobacillus thermodenitrificans*) NIBRBAC000509282 균주(수탁번호: KACC 92468P)에 대한 계통수를 도시한 그림이다.

도 13은 우레이바실러스 수위넨시스(*Ureibacillus suwonensis*) NIBRBAC000509263 균주(수탁번호: KACC 92467P)에 대한 계통수를 도시한 그림이다.

도 14는 우레이바실러스 써모필루스(*Ureibacillus thermophilus*) NIBRBAC000509402 균주(수탁번호: KACC 92469P)에 대한 계통수를 도시한 그림이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

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.

실시예 1. 후보 균주의 분리 동정

잉여슬러지를 효과적으로 분해할 수 있는 세균을 찾고자 하수슬러지, 퇴비, 농경지토양 및 축산폐수에서 시료를 채취하였고, TSB 고체배지에 채취된 시료를 접종하여 65℃에서 O/N 배양하였다. 배양 과정에서 i) 65℃에서 세포 성장이 가능하고, ii) 단백질 분해효소를 생산하는 세균을 탐색하였다.

1-1. 고온내성 균주 7종 분리

NGS(Next Generation Sequencing) 방법을 이용하여 13개 지점의 오염환경에서 원핵생물 중 다양성(균집) 및 기능 유전자(shotgun metagenome) 분석을 수행하였다.

고온 폐수를 처리하는 하수슬러지 시료에서 분리한 균주(21BR-02, 21BR-03)와 퇴비 시료에서 분리한 균주(21BR-12)의 경우, 다른 시료에서 분리한 균주에 비해 높은 생물 다양성(Shannon 지수)을 나타내었고, 이중 21BR-12 균주의 경우 faith PD 지수가 상대적으로 낮은 것으로 보아 미생물 군집을 구성하는 분류군의 계통 발생학적 유사도가 상대적으로 높은 것으로 나타났다.

다양한 시료를 TSB 고체 배지상에 접종하였다. 24시간 경과 후, 고체배지상에 관찰된 콜로니(colony)를 순수분리하여 새로운 배지에 접종하였으며, 스킴 밀크(skim milk) 고체배지에서 활성을 보이는 균주를 선별하였다. 총 7종의 균주가 선별되었다.

[표 1]

환경 시료	초기 균주번호	분리지역	비고
퇴비	COMP 65-12	강원도 춘천 신북읍 용산리	#2
	COMP SKIM 14	강원도 춘천 신북읍 용산리	#4
슬러지	SKM 65-1	부산 사하구 신평동	#1
	SLUSM 65-1	부산 사하구 신평동	#7
축산폐수	Pond 65-2	강원도 춘천 신북읍 용산리	#3
	Barn 65-1	강원도 춘천 신북읍 용산리	#6
농업환경	Rice field 65-1	강원도 춘천 신북읍 용산리	#5

[도 1]을 참조하면, 선별된 고온내성 원핵생물의 생장곡선 측정결과, 7개의 균주 모두가 초기 2시간에서 최장 7시간의 유도기를 갖는 것으로 관찰되었으며, 2~4 시간 내에 급격한 성장을 나타내는 것으로 관찰되었다.

1-2. 단백질 분해 활성을 갖는 균주 선별

- [0056] 선별된 7종 균주를 스킵 밀크(skim milk) 고체배지 상에 접종 후 형성되는 양상을 토대로 고온성 단백질 분해효소 활성을 관찰하였다.
- [0057] 스킵 밀크(skim milk) 고체배지는 아래의 방법으로 준비하였다.
- [0058] 먼저, 1L bottle에 Difco 社의 스킵 밀크(Cat #232100) 10g을 500ml 증류수에 첨가하고, 첨가된 스킵 밀크(skim milk)가 완전하게 녹을 때까지 가열하여 교반하였다. 다른 1L bottle에 Difco 社의 bacto agar 20g을 500ml 증류수에 첨가하였다. 이들을 121℃, 1.5기압 조건에서 15분간 멸균한 후, 60℃까지 냉각하고, 2개의 액체배지를 혼합하여 페트리 접시(petridish)에 넣어 Skim milk 고체배지를 준비하였다.
- [0059] 상기 실시예 1-1의 7종 균주는 TSB 고체배지에서 배양된 균체를 액체배지에 접종한 후, 65℃에서 O/N 배양하였다.
- [0060] 상기 배양된 7종 균체 5 μ l를 스킵 밀크(skim milk) 고체배지에 접종하고, 65℃에서 O/N 배양한 후, 배지에 생성된 클리어 존(clear zone)의 크기를 관찰하였다.
- [0061] [도 2]를 참조하면, 퇴비에서 분리된 COMP 65-12(#2) 균주 및 슬러지에서 분리된 SLUSM 65-1-3(#7) 균주에서 뚜렷한 클리어 존(clear zone)이 관찰되어 단백질 분해효소를 분비하는 활성이 있는 것이 재확인되었다. 나머지 균주들에서는 클리어 존(clear zone) 형성이 뚜렷하지 않았는데, 최초 균주 선별 과정에서 스킵 밀크(skim milk) 배지(media)를 통해 단백질 분해능을 관찰하고 이를 기반으로 최종 7종의 균주를 선별하는 과정으로 연구를 수행하였으나, 균주별 활성도의 차이로 인해 고농도 스킵 밀크(skim milk) 배지(media) 상에서 클리어 존(clear zone)이 불규칙적으로 형성되었을 것으로 사료된다.
- [0063] 1-3. 지질분해 활성을 갖는 균주 선별
- [0064] 또한, 세포막을 구성하는 인지질 성분을 분해하는 효소를 생산할 가능성을 고려하여, 지질분해 활성도를 시험하였다.
- [0065] 지질분해 활성도를 시험에 사용된 Sierra Lipolytic Agar 고체배지는 아래 방법으로 준비하였다.
- [0066] 1L bottle에 MBcell 社의 Sierra Lipolytic Agar(Cat # MB-S1415) 40.1g을 990ml 증류수에 첨가하고, 121℃, 1.5기압 조건에서 15분간 멸균하였고, 멸균된 배지를 70℃까지 냉각하였다. 냉각된 배지에 10ml의 Tween 80(MB-T1861)을 첨가한 후, 페트리 접시(petridish)에 넣어 Sierra Lipolytic Agar 고체배지를 준비하였다.
- [0067] 상기 실시예 1-1의 7종 균주를 TSB 고체배지에서 배양하여 분리한 균체를 각각 액체배지에 접종한 후, 65℃에서 O/N 배양하였다.
- [0068] 상기 배양된 7종 균체 5 μ l를 Sierra Lipolytic Agar 고체배지에 각각 접종하고, 65℃에서 O/N 배양한 후, 배지에 생성된 hollow zone의 크기를 관찰하였다.
- [0069] 관찰 결과, [도 3]을 참조하면, 퇴비에서 분리된 COMP 65-12(#2) 및 축산폐수에서 분리된 Pond 65-2(#3) 균주에서 뚜렷한 할로우 존(hollow zone)이 관찰되어 지질분해 활성이 있는 것으로 확인되었다.
- [0071] 1-4. Protease Assay Kit를 이용한 단백질 분해효소 활성 측정
- [0072] Protease Assay Kit를 통해 선별된 7개 균주별 단백질 분해효소 활성도 정량분석 결과, COMP 65-12(#2) 균주가 12.2%의 활성을 나타냈고, SKM 65-1(#1) 균주가 9.7%의 활성을 나타내었으며, COMP SKIM 14(#4) 균주가 6.6%의 활성을 나타내는 등 7종 균주 모두 단백질 분해효소 활성을 것으로 측정되었다([도 4] 참조).
- [0073] 상기 3종 균주 이외에 다른 균주에서는 다소 낮은 활성이 측정되었는데, 이는 Protease Assay Kit의 최적 실험 온도가 37℃로, 기질로 주입된 카세인(casein) 성분이 고온에서 구조가 변성되어 고온내성 세균의 단백질 분해효소와 결합하지 못하고 분해 기전이 원활하게 수행되지 못하였기 때문으로 분석된다. 이를 보완하고 실제 고온에서의 슬러지 분해 효과를 관찰하기 위해 하수처리시설에서 확보한 잉여슬러지를 대상으로 7종 균주를 주입하여 65℃ 조건에서 tCOD를 sCOD로 전환하는 활성을 측정하였다.

[0075] 실시예 2. 2종 균주의 sCOD 전환율 평가

[0076] 우선 SKM 65-1(#1) 균주와 COMP 65-12(#2) 균주의 혼합 배양체를 이용하여 슬러지 내 고형물 및 바이오매스(biomass)를 sCOD로 전환시키는 연구를 수행하였다. SKM 65-1(#1) 균주와 COMP 65-12(#2) 균주를 TSB 배지에서 0/N 배양하고, 배양체를 동일 양으로 혼합한 후, 플라스크 내 100ml로 분취된 잉여슬러지에 주입하였으며, 65℃ 온도조건에서 총 4일간 정치배양하면서 일별 액상시료를 채취하여 CODkit(휴마스)로 고형물에서 전환된 sCOD를 하기 [식 1]에 따라 분석하였다.

[0077] [식 1]

(실험군 24hr sCOD - 실험군 0hr sCOD)

sCOD 전환율 (%) = ----- X 100 - 100

(대조군 24hr sCOD - 대조군 0hr sCOD)

[0078]

[0079] 잉여슬러지 상태변화 모니터링 결과, 총 4일간의 배양 과정을 통해 고점도의 슬러지 바이오매스(biomass)가 묽은 액상 형태로 전환되는 현상을 관찰할 수 있었다([도 5] 참조).

[0080] 또한, 잉여슬러지 내 고온내성 단백질 분해효소 생산 균주 2종 주입 실험군 및 미주입 실험군 간의 sCOD 전환율 모니터링 결과를 정리한 [도 6]을 참조하면, 2종 균주[SKM 65-1(#1) 균주와 COMP 65-12(#2) 균주] 주입 실험군은 미주입 실험군과 비교하여 약 154%(1,841.4mg/L) 상승된 sCOD 농도가 관찰되었으며, 특히 1일차 배양 과정에서 가장 높은 전환율을 보였다. 이러한 결과를 통해 비록 잉여슬러지가 자체적으로 고온 배양시 바이오매스를 sCOD로 전환시킬 수 있으나, 본 시험을 통해 분리 동정된 단백질 분해효소 생산 균주들을 추가로 주입함으로써 더욱 향상된 sCOD 전환효율을 확보할 수 있음을 확인할 수 있었다.

[0082] 실시예 3. COMP 65-12 균주 및 4종 복합균주의 농축슬러지 sCOD 전환율 평가

[0083] COMP 65-12(#2) 단일 균주와 이를 포함한 4종 균주를 혼합하여 복합균주의 sCOD 전환율을 평가하였다. 4종 복합균주는 아래와 같다.

[0084] [표 2]

환경 시료	초기 균주번호	분리지역	비고
퇴비	COMP 65-12	강원도 춘천 신북읍 용산리	#2
	COMP SKIM 14	강원도 춘천 신북읍 용산리	#4
슬러지	SKM 65-1	부산 사하구 신평동	#1
	SLUSM 65-1	부산 사하구 신평동	#7

[0085]

[0086] 상기 COMP 65-12(#2) 균주 및 이를 포함하는 4종 미생물들을 각각 TSB 액체배지에 접종하고, 65℃에서 0/N 동안 진탕배양을 실시하였다. COMP 65-12(#2) 균주 배양액을 준비하였고, 4종 복합 미생물 배양체를 동일한 양으로 혼합하여 4종 복합균주의 혼합액을 준비하였다.

[0087] 하수처리시설에서 채취한 잉여슬러지를 농축하여 농축슬러지를 준비하였고, 500ml 플라스크에 300ml 용량으로 주입하였다. 상기 농축슬러지 시료에 상기 준비된 COMP 65-12(#2) 배양액 및 4종 복합균주의 균체 혼합액을 0.1%(v/v) 농도로 각각 접종한 후, 65℃에서 배양하여 시간별(0, 2, 6, 9 및 12시간)로 시료 채취한 후, 크롬법에 따른 입자성유기물과 용존유기물에 대한 화학적 산소요구량(tCODcr)과 크롬법에 따른 용존유기물에 대한 화학적 산소요구량(sCODcr)을 각각 측정하였다. 비교실험을 위해 동일한 부피의 멸균수를 첨가한 시료를 음성대조군으로 사용하였다.

[0088] 하수처리시설로부터 채취된 농축슬러지 시료의 성상 분석 결과를 정리한 [도 7]을 참조하면, 농축슬러지 시료의 TS(total suspended solids) 값은 2.40(%)로 측정되었고, VS(volatile suspended solids) 값은 1.56(%)로 측정되었으며, VS/TS 값은 65%로 측정되었다. 또한, tCODcr 값은 19,600(mg/l)이었고, sCODcr 값은 100(mg/l)으로 측정되었다.

[0089] 또한, 4종 복합균주를 처리한 슬러지가수분해 sCODcr 전환율 값을 정리한 [도 8]을 참조하면, 4종 복합균주를 처리한 실험군은 멸균수 첨가 음성대조군에 비해 용존유기물에 대한 화학적 산소요구량 sCODcr 값이 더욱 증가하는 것으로 나타났는데, sCODcr 값이 2시간 3,705(mg/l), 6시간 5,130(mg/l), 9시간 5,815(mg/l) 및 12시간 6,620(mg/l)으로 각각 측정되어 음성대조군과 비교하여 전환율이 더욱 개선되는 것을 확인할 수 있었다.

[0090] 또한, COMP 65-12(#2) 단일 균주 처리군과 4종 균주 처리군의 sCOD 전환율을 정리한 [도 9]를 참조하면, COMP 65-12(#2) 단일 균주를 처리한 실험군은 sCOD 전환율이 20% 초반인 반면, 4종 복합균주를 처리한 실험군의 sCOD 전환율은 50% 정도로 측정되어 4종 복합균주가 단일균주에 비해 2배 이상 효과를 갖는 것을 확인할 수 있었다.

[0092] 실시예 4. BMP(Biological methane potential) 테스트

[0093] 상기 4종 복합균주를 활용하여 슬러지를 가수분해하는 경우에 메탄 생산량의 변화를 측정하였다.

[0094] 식중슬러지(Sludge Seeding) 200ml, 균주 처리를 통해 sCOD로 전환된 잉여슬러지 시료 40ml(VS 0.625g), 및 38% FeCl₂ 1.0ml를 혼합하여 플라스크에 넣고, 플라스크의 공기를 질소가스로 치환한 후, Shaking incubator(150rpm, 38℃)에서 메탄가스의 생성량을 측정하였다.

[0095] 메탄가스의 생성량 변화를 정리한 [도 10]을 참조하면, 생슬러지의 메탄가스 수율 0.149(CH₄m³/kgVS_{input})에 비해 65℃로 가온한 생슬러지의 메탄가스 수율이 0.208(CH₄m³/kgVS_{input})로 더 높은 것으로 확인되었다. 또한, 65℃로 가온한 후 본 발명의 상기 4종 복합균주를 첨가한 시험군의 메탄가스 수율이 0.288(CH₄m³/kgVS_{input})로 가장 높은 것으로 확인되었다.

[0096] 상기와 같은 결과를 통해, 현장에서 발생하는 생슬러지(상온) 또는 생슬러지(65℃) 조건에 비해 본 발명의 4종 복합 균주를 적용하는 경우 38.5% 내지 93.3% 개선된 메탄생산 수율 향상이 가능한 것으로 확인되었다.

[0097] 상기와 같은 결과를 통해, 본 발명의 4종 복합균주가 실제 하수처리시설에도 적용 가능하며, 하수처리장의 혐기성 소화 효율을 증대시키고, 메탄가스의 생성을 증가시켜 하수처리장의 에너지 자립화에 기여할 수 있음을 확인할 수 있었다.

[0099] 실시예 5. 미생물 동정 및 계통학적 위치(phylogenetic position) 분석

[0100] 4종 균주의 동정은 다음과 같은 방법으로 진행하였다. 균주의 DNA는 상용화 키트를 사용해 추출하였고, 박테리아의 16S rRNA 구간은 27F(5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') 및 1492R(5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3') 프라이머를 이용하여 중합효소연쇄반응(PCR)으로 증폭한 후, 27F, 1492R, 518F(5'-CCA GCA GCC GCG GTA ATA CG-3'), 및 800R(5'-TAC CAG GGT ATC TAA TCC-3') 프라이머를 사용하여 염기서열을 분석하였다.

[0101] 증폭된 염기서열은 EzBiocloud database(<https://www.ezbiocloud.net/>)를 이용하여 종명을 동정하여 아래 [표 3]에 정리하였고, 2022년 10월 31일 자로 농촌진흥청 국립농업과학원 미생물은행(KACC)에 기탁하여 수탁번호를 부여받았다.

[0102] [표 3]

초기 균주번호	종명	자원관 기탁번호	기탁번호
COMP 65-12(#2)	<i>Parageobacillus toebii</i>	NIBRBAC000509403	KACC 92470P
COMP SKIM 14(#4)	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i>	NIBRBAC000509282	KACC 92468P
SKM 65-1(#1)	<i>Ureibacillus suwonensis</i>	NIBRBAC000509263	KACC 92467P
SLUSM 65-1(#7)	<i>Ureibacillus thermophilus</i>	NIBRBAC000509402	KACC 92469P

[0103]

[0104] 또한, 선별된 균주의 계통분류학적 유연관계를 확인하기 위하여 EzBiocloud database에서 각 균주와 염기서열 유사도가 높은 균주의 정보를 모아 계통수를 작성하였다. 확보된 염기서열은 MEGA6 프로그램에서 제공하는 ClustalW alignment 프로그램을 이용하여 정렬 후, neighbor-joining 알고리즘과 Jukes-Canter 모델을 이용하

여 계통수를 작성하였다([도 11] 내지 [도 14] 참조).

[0105] 이상으로 본 발명의 특징한 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.

수탁번호

[0107] 기탁기관명 : 농촌진흥청 국립농업과학원 미생물은행(KACC)
수탁번호 : KACC92470P
수탁일자 : 20221116

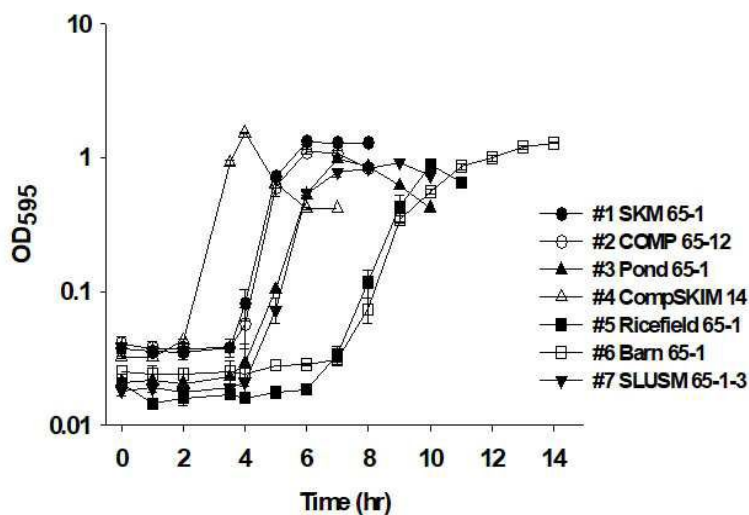
기탁기관명 : 농촌진흥청 국립농업과학원 미생물은행(KACC)
수탁번호 : KACC92467P
수탁일자 : 20221116

기탁기관명 : 농촌진흥청 국립농업과학원 미생물은행(KACC)
수탁번호 : KACC92468P
수탁일자 : 20221116

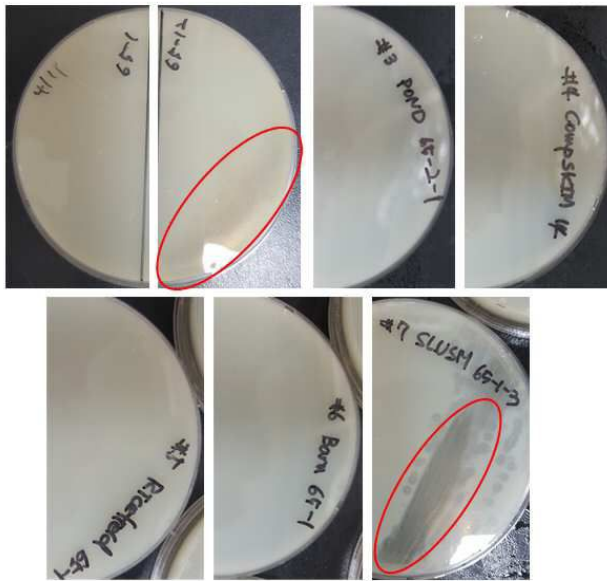
기탁기관명 : 농촌진흥청 국립농업과학원 미생물은행(KACC)
수탁번호 : KACC92469P
수탁일자 : 20221116

도면

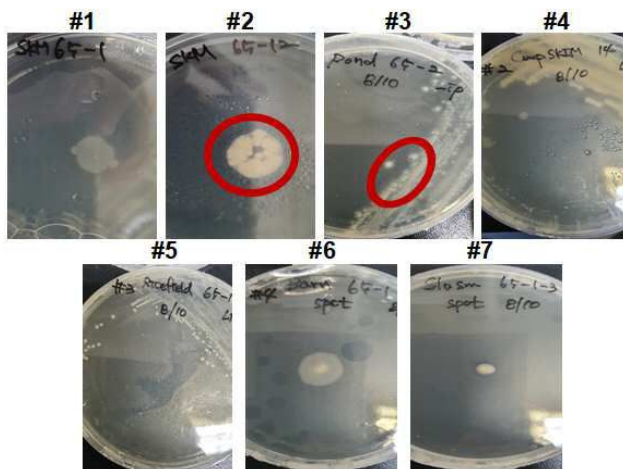
도면1



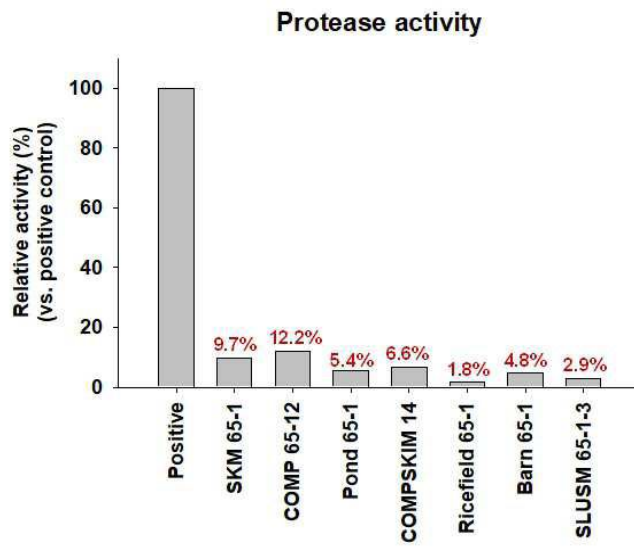
도면2



도면3

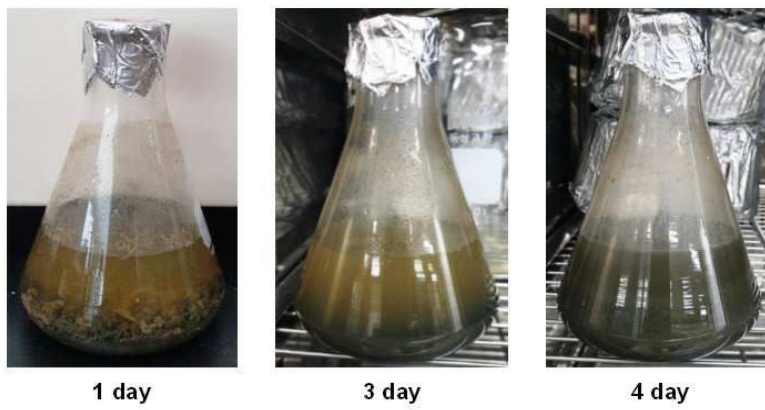


도면4

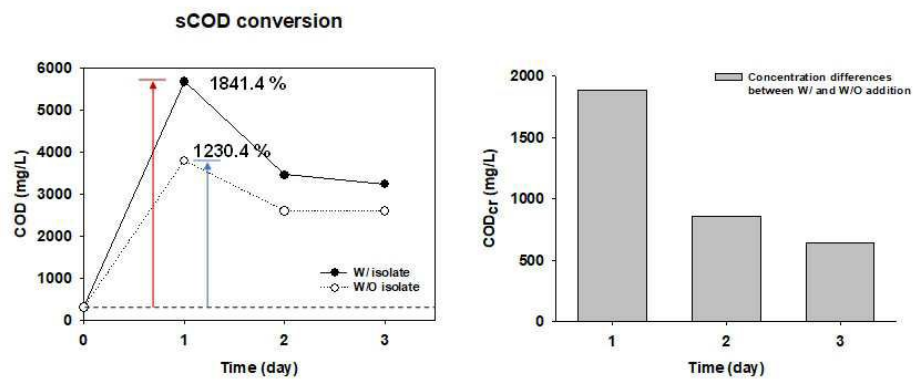


도면5

Sludge biomass => sCOD conversion



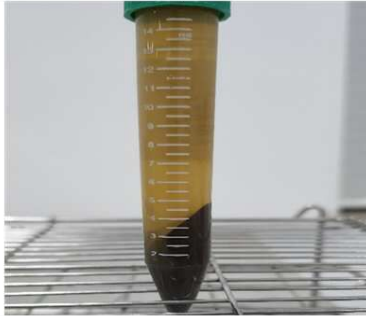
도면6



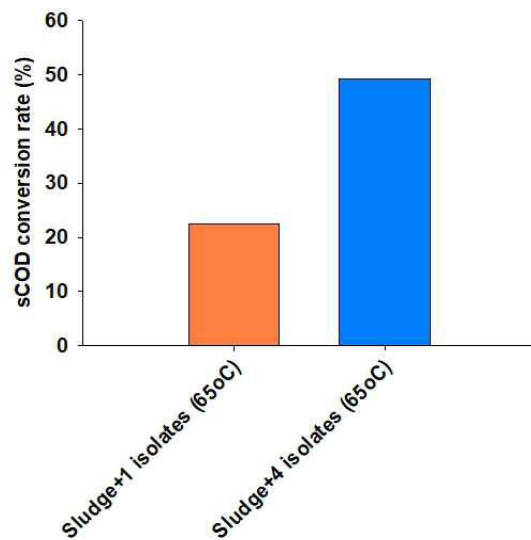
도면7

구 분	농 도	
TS (%)	2.40	
VS/TS (%)	65	
VS (%)	1.56	
tCOD _{cr} (mg/l)	19,600	
sCOD _{cr} (mg/l)	100	

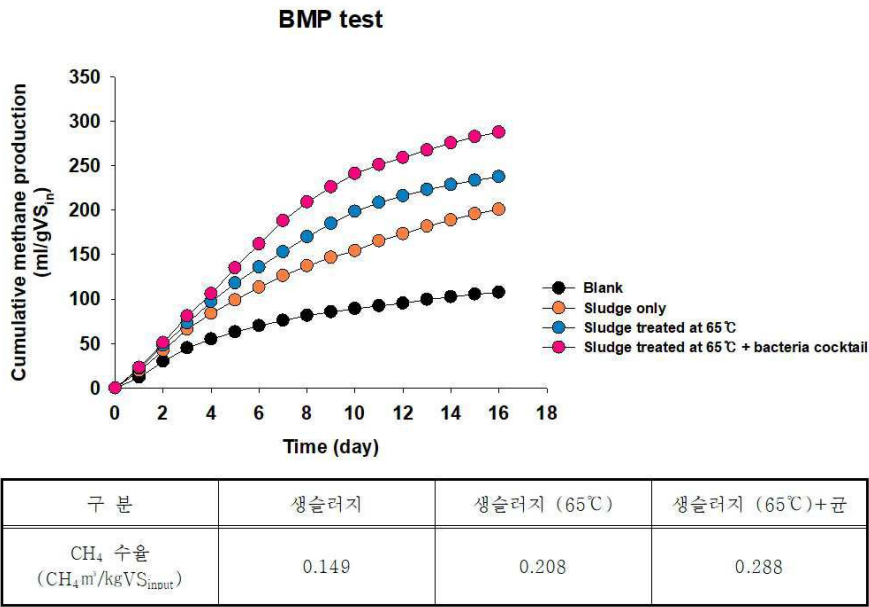
도면8

구분	슬러지가온 (65℃)		슬러지가온 (65℃)+균	
	sCOD _{cr} 농도 (mg/l)	전환율 (%)	sCOD _{cr} 농도 (mg/l)	전환율 (%)
2 시간	2,575	12.7	3,705	18.5
6 시간	3,960	19.8	5,130	25.8
9 시간	4,273	21.4	5,815	29.3
12 시간	4,468	22.4	6,620	33.4
외관				

도면9

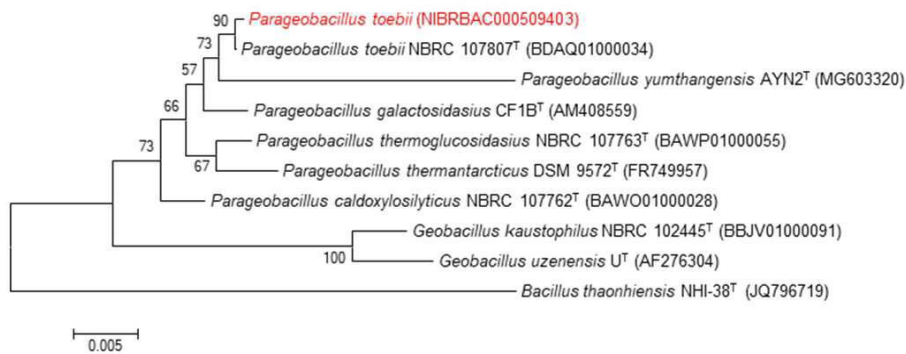


도면10



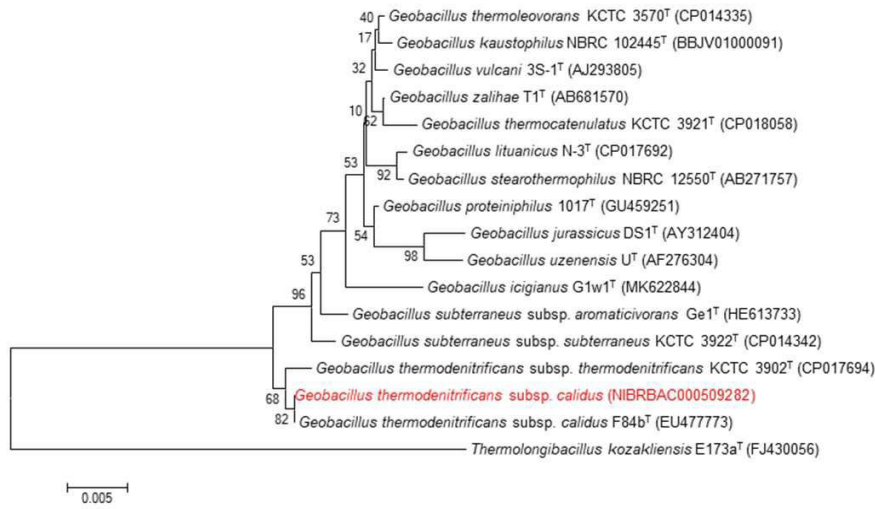
도면11

>NIBRBAC000509403 *Parageobacillus toebii*



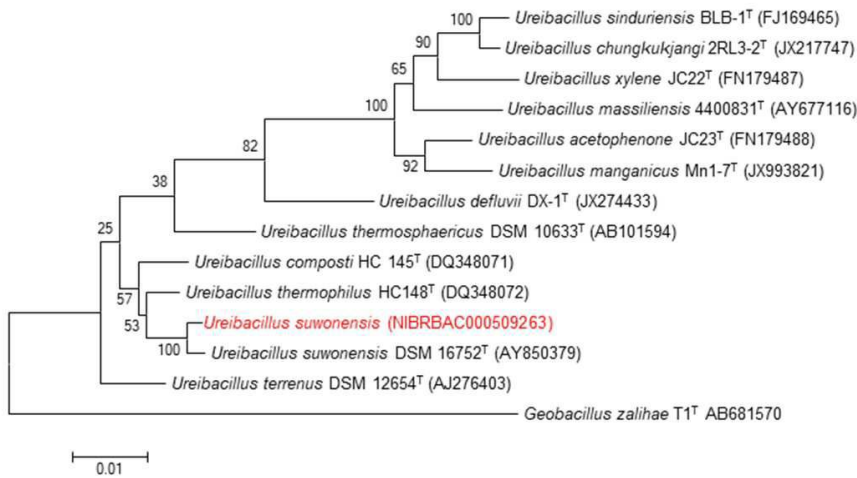
도면12

>NIBRBAC000509282 *Geobacillus thermodenitrificans*



도면13

>NIBRBAC000509263 *Ureibacillus suwonensis*



도면14

>NIBRBAC000509402 *Ureibacillus thermophilus*

