



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0123540
(43) 공개일자 2011년11월15일

(51) Int. Cl.

C12N 11/14 (2006.01) *C12N 1/20* (2006.01)
C12R 1/01 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0043068

(22) 출원일자 2010년05월07일

심사청구일자 2010년05월07일

(71) 출원인

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 가좌동 900

(72) 발명자

윤한대

경남 진주시 칠암동 284-2

윤명근

경상남도 거창군 남하면 양항리 926

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이덕록

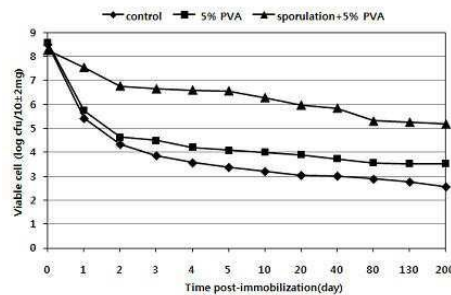
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 바텀애쉬를 이용한 신규한 미생물 담체 및 그 제조방법

(57) 요약

본 발명은 농업용 유용한 미생물고정담체를 제조함에 있어서 석탄저회(bottom ash)를 이용하는 것으로 여기에 코팅물질로서 CMC, PVA를 첨가함과 동시에 고정된 미생물의 포자형성과 그 생존율을 높이기 위하여 TSB 배지를 병용하는 방법을 개시한다.

대표도 - 도10



(72) 발명자

김종민

경상남도 통영시 광도면 황리 1130

조지중

경상남도 사천시 벌리동 주공아파트 204동 703호

특허청구의 범위

청구항 1

미생물운반체로서 석탄저회(bottom ash)를 이용한 미생물고정담체.

청구항 2

미생물운반담체에 코팅물질을 첨가하여서 되는 것이 특징인 미생물고정담체.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 코팅물질이 폴리비닐알콜(PVA) 또는 CMC 중 어느 하나인 것이 특징인 미생물고정담체.

청구항 4

석탄저회(bottom ash)를 이용하여 미생물담체 제조함에 있어서 미생물균주의 포자형성과 코팅법을 병행처리하는 것을 특징으로하는 미생물고정담체의 제조방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 미생물 균주의 포자형성을 유지하기 위하여 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 50mg/L의 농도로 첨가된 TSB 배지를 사용하여 5% PVA 용액을 코팅재료로 병용하여 담체에 고정된 미생물의 생존율을 높이는 것이 특징인 미생물고정담체의 제조방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 화력발전 부산물인 석탄저회(bottom ash)를 미생물 담체로 재활용 하는 방법 및 그 미생물 담체에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 미생물 담체는 미생물 운반체로서 미생물제제화의 중요한 부분이며, 미생물제제에 대한 기능성 미생물의 균체를 이온적으로 흡착해서 미생물의 화학적인 활성을 유지하는 동시에 토양 중에서의 안정화와 제품보존기간 중 활성을 유지하는 것이다. 현재 우리나라에서 사용되는 미생물제제용 담체재료로는 점토광물, 미강, 밀기울, 규조토, 폐사료, 화이트카본 등이 있다. 그러나 상기 담체재료로 사용될 수 있는 물질의 종류는 제한되어 있으며, 따라서, 농업상 유용한 미생물을 보다 안전하고 효율적으로 토양에 운반할 수 있는 새로운 담체 재료의 개발 및 미생물의 생존율 향상방법이 절실히 필요한 실정에 있다.

[0003] 석탄재(ash)중 석탄저회(Bottom ash)는 화력발전을 위해 석탄을 연소시킬 때 소각로 바닥에 발생하는 바닥재로서 총 석탄회 발생량 중에 약 10~15%를 차지하고 있고, 유효재활용은 상대적으로 미진한 상태이며, 이의 적재 및 보관이 포화상태일 뿐만 아니라 대부분 매립·폐기되고 있는 실정이다.

- [0004] 석탄회(ash)는 화력발전소 또는 공장 등에서 화력으로 이용되고 폐기되는 것으로서 일반적으로 플라이 애쉬(fly ash)와 바텀 애쉬(bottom ash)로 구분된다. 이 같은 석탄회(ash)는 포틀랜드 시멘트 및 모래와 함께 고유동성 충전조성물로 사용되는 방법이 국내특허 10-398076호에 개시되어 있다.
- [0005] 환경 폐기물로서의 비회(플라이 애쉬)는 연소시 극히 미세한 입자로서 SiO_2 가 주성분이며 저회(바텀 애쉬)는 연소시 저부에 고형화된 압괴형태의 물질로 분쇄하여 사용되는 것이다.
- [0006] 환경오염을 유발하는 상기 산업폐기물에 지렁이 분변토, 쌀겨 등과 혼합하여 비료조성물로 사용하는 방법에 대하여는 국내특허 10-854587호에 개시되어 있다. 또 플라이 애쉬에 석회석과 물을 넣어 과립화(granule)한 후 분뇨, 톱밥을 혼합하여 유기질 비료를 제조하는 방법은 국내특허 공개번호 2002-23591호에 개시되어 있다.
- [0007] 한편, 화력발전소 등에서 발생하는 석탄재(ash)를 담수로 처리하여 정제된 석탄재를 얻는 방법은 국내특허 제 10-466847호에 개시되어 있으며 본 발명에서는 이와 같은 정제된 석탄재를 사용하는 것이 아니라 석탄저회를 그 원료로 사용한다. 상기 정제된 석탄재는 건축 및 토목 공사용 콘크리트재료에 적합하다.
- [0008] 이상 설명한 바와 같이 지금까지 석탄회중 저회(bottom ash)를 미생물 담체로 재활용한 예와 실험결과는 연구된 바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 따라서, 본 발명은 폐기되는 석탄회를 이용하여 토양유용 미생물균체의 흡착, 활성이 높고 토양중에서 생존 안정성이 우수한 신규한 미생물 고정담체를 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

- [0010] 본 발명의 상기 목적은 새로운 담체재료 개발을 위해 화력발전 부산물인 석탄저회 (bottom ash)의 표면관찰 및 유해중금속 분석, 미생물 부착실험 등을 통해 미생물담체로서의 가능성을 확인한 다음, 상기 실험한 결과를 토대로 유기물질을 혼합하여 친환경 농자재를 개발하고 평가함으로써 달성하였다.

발명의 효과

- [0011] 본 발명은 석탄저회(bottom ash)를 미생물 고정담체(carrier)로 사용하는 효과가 있고 담체에 고정된 미생물의 생존율을 안정하게 높이는 코팅물질이 코팅된 미생물 운반 담체를 제공하는 뛰어난 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [0012] 도1은 미생물 운반담체의 표면을 보인 사진도이다.
- 도2는 석탄저회의 형태를 FE-SEM 분석한 사진도이다.
- 도3은 GS01 균주를 TSB 배지상에서 100mL 플라스크 배양했을 때 세포성장을 보인 그래프이다.
- 도4는 석탄저회에 고정된 GS01 균주를 분석한 FE-SEM 사진도이다.
- 도5는 석탄저회에 고정된 균체를 수세전 및 수세후에 분석한 FE-SEM 사진도이다.

도6은 CMC 코팅 후 석탄저회의 형태를 분석한 FE-SEM 사진도이다.

도7은 PVA 코팅 후 석탄저회의 형태를 분석한 FE-SEM 사진도이다.

도8(A,B)는 각 코팅물질로 코팅한 10일 경과후 석탄저회에 고정된 생균의 수를 나타낸 그래프이다.

도9는 말라기트 그린 염색약을 이용하여 스테인 한 후 포자를 관찰한 사진도이다.

도10은 저장기간동안 석탄저회에 생존균 수의 경시적 변화를 보인 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013]

본 발명은 화력발전 부산물인 석탄저회 (bottom ash)를 미생물 담체로 재활용하는 방법에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 본 발명은 농토양으로부터 우수한 항진균활성 및 효소활성을 가진 유용한 토양 토착미생물을 선별하고, 분리한 미생물의 최적 성장조건을 확인하며, 이를 토양으로 운반할 담체로서의 석탄저회의 유용성 및 안전성을 확인하기 위해 유도결합플라즈마분광법(ICP) 분석을 통한 유해중금속 성분확인 및 주사전자현미경(SEM)을 이용한 표면관찰을 수행하였다. 분석결과, 다공성 표면을 가진 입체적인 구조로 미생물이 부착되기 용이한 조건을 가졌으며, 유해중금속 함량은 현재 국내 관련법규에서 규정하고 있는 토양오염우려기준치(1 지역 기준) 이하로 안전한 수준이었다. 그리고 미생물의 석탄저회 고정 후 생존력 및 활성을 유지시키기 위해 carboxymethyl cellulose (CMC)와 polyvinyl alcohol (PVA)를 이용한 코팅법 및 포자형성유도법을 사용하여 실험한 결과, CMC 코팅에 비해 PVA 코팅이 미생물의 생존을 향상에 효과적이었고 농도 5% PVA 용액을 코팅한 경우 생존율이 가장 높았다. 포자형성유도법과 PVA코팅법을 병용한 후 저장하고 시간경과에 따라 담체에 고정된 미생물의 생존율을 측정한 결과는, 무처리군 (대조군)의 미생물 생존율이 처리된 시료의 미생물 생존율보다 급격히 감소하였고, 저장 200일 후의 미생물 생존율은 처리군이 무처리군에 비해 훨씬 높았다. 처리군의 생균수는 200 일 경과 후에도 $105 \text{ cfu}/10 \pm 2 \text{ mg}$ 수준을 유지하였다. 따라서 본 발명의 실험결과, 석탄저회를 미생물담체로서 재활용하는 방안은 충분한 가능성을 가지고 있었음이 판명되었고, 이를 이용한 친환경농업의 농자재를 개발함으로써 녹색성장 산업에 유용하게 사용할 수 있음이 확인되었다.

[0014]

미생물 운반체 또는 미생물 담체는 미생물제제화의 중요한 부분이며, 미생물제제에 대한 기능성 미생물의 균체를 이온적으로 흡착해서 미생물의 화학적인 활성을 유지하는 동시에 토양 중에서의 안정화와 제품보존기간 중 활성을 유지하는 역할을 한다. 현재 우리나라에서 사용되는 미생물제제용 담체재료로는 점토광물, 미강, 밀기울, 규조토, 폐사료, 화이트카본 등이 사용되고 있다. 그러나 그러한 담체재료로 사용될 수 있는 물질의 종류와 양은 매우 한정되어 있으며, 따라서 유용미생물을 보다 안전하고 효율적으로 농업토양에 운반할 수 있는 새로운 담체재료의 개발 및 균의 생존율 향상방법이 필요한 실정이다. 본 연구는 새로운 담체재료를 개발하기 위해 석탄저회 (bottom ash)의 미생물담체로서의 가능성을 평가하기위해 수행되었다. 석탄저회는 화력발전을 위해 석탄을 연소시킬 때 소각로 바닥에 발생하는 바닥에 남는 재이다. 석탄저회는 총 석탄회 발생량 중에 약 10 ~15%를 차지하고 있고, 유효재활용은 상대적으로 미진한 상태이며, 이의 적재 및 보관이 포화상태일 뿐만 아니라 대부분 매립·폐기되고 있는 실정이다.

[0015]

[0016]

따라서 본 발명에서는 이 같은 석탄저회(bottom ash)를 미생물담체재료로 재활용하는 방안을 모색하기 위해 주사전자현미경 (FE-SEM) 관찰 및 유도결합플라즈마분광법 (ICP)을 이용하여 석탄저회의 표면을 관찰하고 함유 유해중금속 성분을 분석하였다. 또한, 항진균활성 및 섬유소분해효소력이 우수한 *Paenibacillus polymyxa* GS01 균주를 담체고정화 미생물로 사용하였다. 석탄저회(Bottom ash)를 담체재료로 사용해 상기 GS01 균주를 고정화하고 CMC, PVA 코팅 및 포자형성유도를 이용하여 생존율을 향상시키는 실험을 반복하여 수행하였다.

[0017]

실시예 1 : 담체선발

[0018]

본 발명의 공시재료 석탄저회 (bottom ash)와 석탄비회 (fly ash)는 고성군 하이면에 위치한 삼천포화력발전소에서 채취하였고, 하수처리용 담체재료로 이용되는 5종의 골재 미사질 모래(도1A), 왕사(도1B), 방해석(도1C), 제올라이트(도2A), 쇄석(도2B)와 함께 육안, 광학현미경, 주사전자현미경 관찰을 통해 표면을 비교분석한 결과, 석탄저회는 다공성 표면을 가진 입체적인 구조로 많은 미생물들이 흡착되기에 적절한 조건을 가지고 있었음을 확인하였다(도2C, 도2D). 그리고 유도결합플라즈마분광법을 이용하여 석탄저회에 함유된 유해중금속 성분들을

분석한 결과, Cu, Pb, Cr만이 미량으로 검출되었다. 이들의 검출량을 현재 국내 관련법규에서 규정하고 있는 토양오염우려기준(1 지역 기준)과 비교해본 결과 기준치에 훨씬 못 미치는 수준이었다(표 1).

[표 1] Soil contamination standards and detection amount of harmful materials in bottom ash

Sample	Test items (Unit: mg/kg)										
	Cd	As	Cu	Pb	Zn	Ni	Cr ⁶⁺	Hg	PCE	TCE	OP
Soil contamination standards (region 1*)	4	25	150	200	300	10	5	4	4	8	10
bottom ash	N.D. ^b	N.D.	0.35	0.021	N.D.	N.D.	0.075	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

[보기] * Region 1: rice paddies and fields, and school sites
b Non-detected

실시예 2 : 미생물담체의 제조

본 발명 담체 고정화를 위한 상기 GS01 균주의 최적 접종조건을 알아보기 위해 OD (optical density)값 측정과 생균수 측정을 통해 성장곡선을 확인해 본 결과, 상기 균주는 배양개시 16시간경과 후 정체기에 도달했으며 최대 생균수는 2.44×10^9 cfu/mL이었고 배양 12~16시간 사이에서 얻을 수 있었다. 최대 OD값은 1.25로 배양 12시간경과 후에 도달하였다(도3).

상기 균주를 석탄저희에 고정화 시킨 후의 표면형태(도4)와 고정 후 증류수를 이용한 탈거 후의 표면형태(도5)를 주사전자현미경을 이용하여 관찰한 결과, 석탄저희의 다공성 표면 중 함몰된 부분에 많은 수의 균체들이 부착되었으며 돌출된 부위에는 비교적 적은 수의 균체들이 부착된 것을 확인하였다(도4A, B, C 및 도4D). 미생물 탈거 후에는 석탄저희 표면에서 균체가 거의 관찰되지 않았다(도5Ba, 도5Bb). 상기 석탄저희 한 조각 (중량: 10 $\pm$ 2 mg)에 고정화된 생균수는 약 10^8 cfu/10 $\pm$ mg 수준이었다(표 2).

[표 2] Average of cell immobilization per a grain of bottom ash

Sample	1	2	3	4	5	6	7	8	Average
cfu/grain ($\times 10^4$)	1.7	3.41	3.18	3.01	1.98	2.84	2.58	3.23	2.74
Weight (mg)	10	10	9	11	10	12	9	10	10 $\pm$ 2
The average of viable cell per one grain of BA:									
2.74 $\times 10^7$ /10 $\pm$ 2 mg									

실시예 3 : 담체에 고정된 미생물의 생존율 조사

본 발명 담체에 고정된 미생물의 생존율을 향상시키기 위해 CMC (carboxymethylcellulose), PVA (polyvinylalcohol)를 코팅물질로 사용하여 미생물이 고정된 석탄저희 표면을 농도별로 코팅한 후 10일이 경과한 시점에서 생균수를 측정한 결과, CMC 코팅(도6)에 비해 PVA 코팅(도7)이 균의 생존율 향상에 효과적이었고 농도 5% PVA 용액을 코팅한 경우 생존율이 가장 높았다(도8B). 코팅 후 석탄저희 표면을 주사현미경으로 관찰한 결과, CMC 코팅의 경우 농도와 상관없이 모든 시료의 표면에 균열이 발생하였고(도6Ab, 도6Bb, 도6Cc), PVA 코팅의 경우 균열은 발생하지 않았으나(도7Ab, 도7Bb) 농도 10% PVA 코팅의 경우 두터운 PVA층 때문에 시료의 표면에서 균체를 관찰할 수 없었다(도7Cb).

Malachite green 염색법을 이용하여 GS01균주의 포자를 확인하였고(도9), 미생물의 담체 고정화 후의 생존율을 향상시키기 위해 여러 조건의 배지를 이용하여 상기 GS01 균주의 포자형성 (sporulation)을 유도하였다. 포자형성을 유도한 결과, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 50mg/L 농도로 첨가된 TSB배지에서 생성된 포자 수 (8.74×10^7 spore/mL)가 가장 많았다. 1/10 TSB배지의 경우 포자형성율은 60~80%로 높았으나, 형성된 포자의 수가 TSB배지보다 상대적으로 적었다.

[0027] 포자형성유도법과 PVA 코팅법을 병행한 후 저장하고 시간경과에 따라 담체에 고정된 미생물의 생존율을 측정한 결과(도10), 무처리군 (대조군)의 균 생존율이 처리된 시료의 균 생존율보다 급격히 감소하였고, 저장 200일 후의 균 생존율은 처리군이 무처리군에 비해 훨씬 높았다. 처리군의 생균수는 200일 경과 후에도 10^5 cfu/10±2 mg 수준을 유지하였다(표 3).

[표 3] Effect of media containing manganese sulfate for spore production

NO.	cultural condition (100ml)	Maximum number of viable cells (CFU/mL)	Maximum number of spore cells (CFU/mL)	Sporulation (%)*	Fermentation time (h)
1	1/10 TSA + MnSO ₄ ·H ₂ O 1mg	4.72×10^6	8.1×10^6	88.7	90
2	1/10 TSA + MnSO ₄ ·H ₂ O 2mg	6.21×10^6	2.78×10^6	88.8	90
3	1/10 TSA + MnSO ₄ ·H ₂ O 5mg	6.12×10^6	6.67×10^6	71.6	90
4	NU + MnSO ₄ ·H ₂ O 1mg	1.18×10^6	6.77×10^4	61.9	90
5	NU + MnSO ₄ ·H ₂ O 2mg	1.08×10^6	6.64×10^4	49.4	90
6	NU + MnSO ₄ ·H ₂ O 5mg	1.08×10^6	6.14×10^4	48.6	90
7	TSA + MnSO ₄ ·H ₂ O 5mg	1.68×10^8	6.81×10^7	88.8	90
8	TSA + MnSO ₄ ·H ₂ O 5mg	2.11×10^8	6.74×10^7	41.4	90
9	TSA + MnSO ₄ ·H ₂ O 10mg	6.46×10^7	2.61×10^7	24.6	90
10	TSA	6.88×10^8	6.25×10^7	8.4	90

[참고] * Spore production was carried out at 50°C.
* Sporulation (%) = viable cells / spore cells × 100

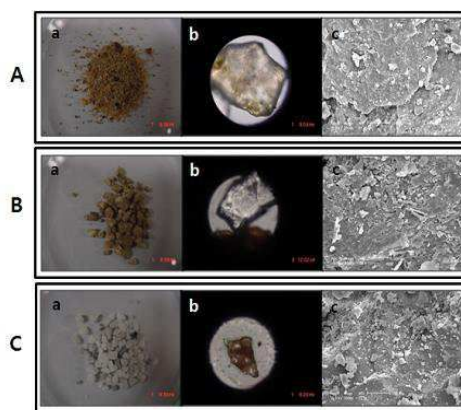
[0028]

산업상 이용가능성

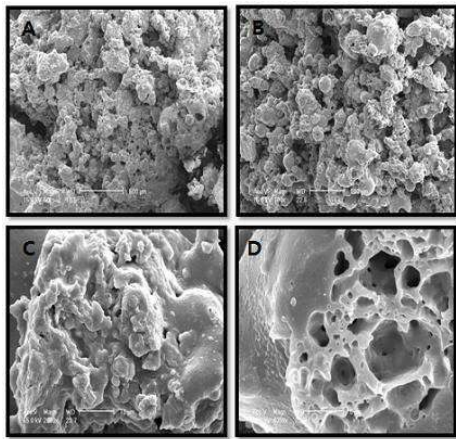
[0029] 본 발명은 석탄저회(bottom ash)를 재활용하여 PVC 코팅물질을 이용한 농업용 미생물고정담체를 제공하는 뛰어난 효과가 있으므로 녹색성장산업상 매우 유용한 발명인 것이다.

도면

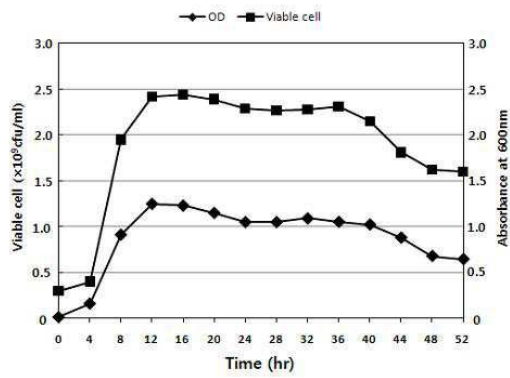
도면1



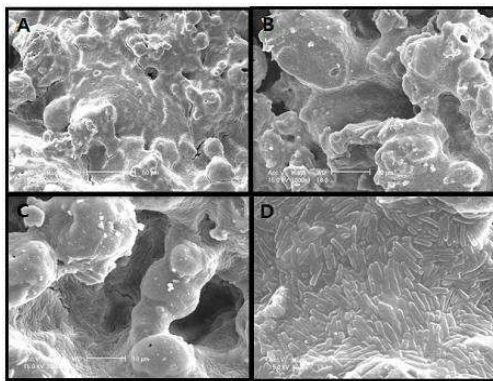
도면2



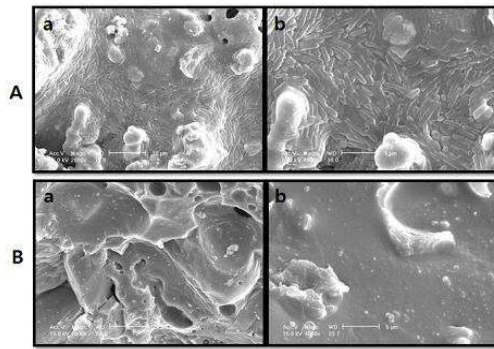
도면3



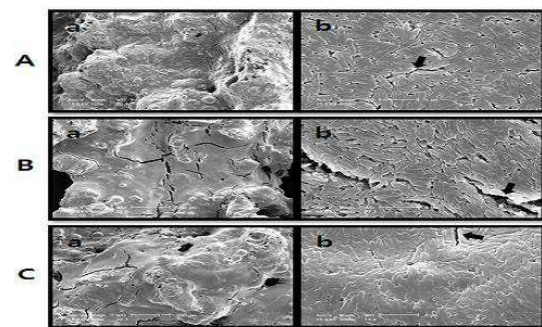
도면4



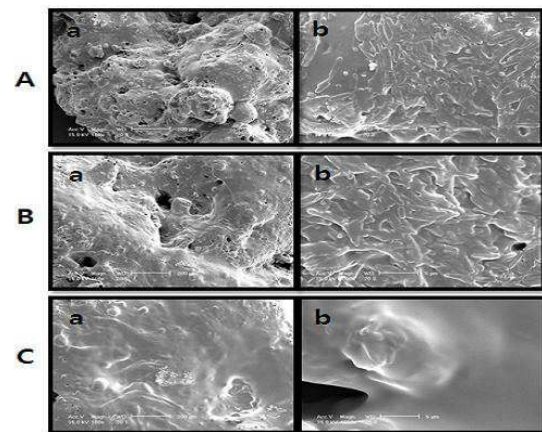
도면5



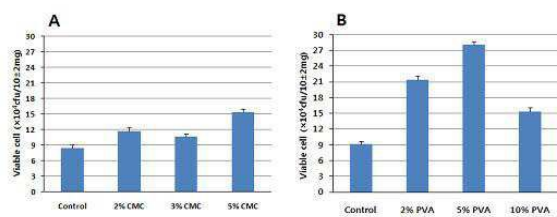
도면6



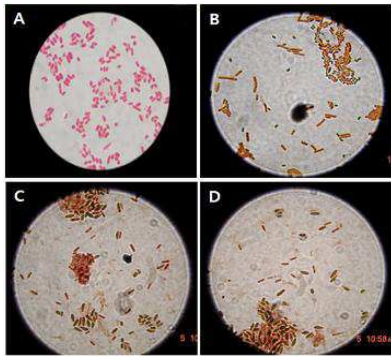
도면7



도면8



도면9



도면10

