(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0159769
(43) 공개일자 2022년12월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) *A61K 8/99* (2017.01)
A61Q 19/00 (2006.01) *B01D 53/84* (2006.01)
B09C 1/10 (2006.01) *C02F 3/34* (2017.01)
C11D 3/38 (2006.01) *C12N 9/16* (2006.01)
C12R 1/425 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/205 (2021.05)
A61K 8/99 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0067791
(22) 출원일자 2021년05월26일
심사청구일자 2021년05월26일

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
조경숙
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 이화여자대학교
양효주
서울특별시 서대문구 이화여대길 52(대현동)
(74) 대리인
김순웅

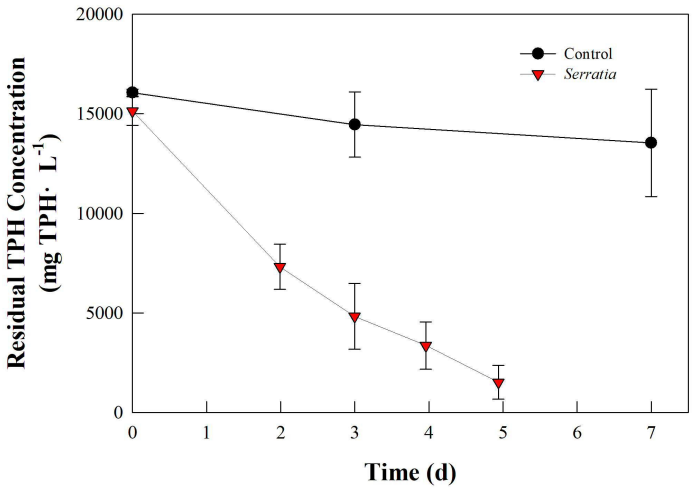
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 **신규한 세라티아 속 균주 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 신규한 세라티아 속(*Serratia* sp.) DM1 균주 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명을 통해 분리된 상기 신규한 세라티아 속 DM1 균주는 우수한 유류 분해능 및 바이오계면활성제 생산능을 가진 바, 2차 오염물질의 발생 문제없이 석유계 탄화수소(Petroleum hydrocarbons, PHs)에 의한 오염 정화 방법에 유용하게 활용할 수 있을 뿐만 아니라, 본 발명에 따른 세라티아 속 DM1 균주 및 이로부터 생산된 바이오계면활성제는 세제나 비누 또는 화장품 분야 등 계면활성제를 필요로 하는 다양한 산업 분야에 유용하게 활용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61Q 19/00 (2013.01)
B01D 53/84 (2013.01)
B09C 1/10 (2013.01)
C02F 3/34 (2013.01)
C11D 3/381 (2013.01)
C12N 9/16 (2013.01)
C12R 2001/425 (2021.05)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711132147
과제번호 2019R1A2C2006701
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명 오염토양 정화효율 향상과 non-CO2 온실가스 배출 저감을 위한 오믹스 기반 rhizoremediation
기 여 율 1/1
과제수행기관명 이화여자대학교 산학협력단
연구기간 2019.03.01 ~ 2022.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

세라티아 속(*Serratia* sp.) DM1 균주(KCTC14571BP).

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 균주는 유류 분해능을 가지는 것을 특징으로 하는, 균주.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 균주는 계면활성제 생성능을 가지는 것을 특징으로 하는, 균주.

청구항 4

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 따른 세라티아 속(*Serratia* sp.) DM1 균주(KCTC14571BP)를 유효성분으로 포함하는, 유류 오염 정화용 조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서,

상기 유류는 탄소수 10개 이상의 고분자 석유계 탄화수소를 포함하는 것을 특징으로 하는, 유류 오염 정화용 조성물.

청구항 6

제 4항에 있어서,

상기 유류는 디젤, 윤활유, 항공유, 휘발유, 등유, 경유, 중유 및 이들의 혼합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 석유계 유류인 것을 특징으로 하는, 유류 오염 정화용 조성물.

청구항 7

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 따른 세라티아 속(*Serratia* sp.) DM1 균주(KCTC14571BP)를 유류 오염원에 처리하는 단계를 포함하는, 유류 오염 정화 방법.

청구항 8

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 따른 세라티아 속(*Serratia* sp.) DM1 균주(KCTC14571BP)를 유효성분으로 포함하는 바이오계면활성제(biosurfactant) 생산용 미생물 제제.

청구항 9

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 따른 세라티아 속(*Serratia* sp.) DM1 균주(KCTC14571BP)를 배양하는 단계를 포함하는 바이오계면활성제 생산 방법.

청구항 10

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 따른 세라티아 속(*Serratia* sp.) DM1 균주(KCTC14571BP), 이의 배양액, 이의 추출물 및 이의 무세포 상등액으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 바이오계면활성제.

청구항 11

제 10항에 있어서,

상기 바이오계면활성제는 리파아제(lipase) 효소를 포함하는 계면활성제인 것을 특징으로 하는, 바이오계면활성제.

청구항 12

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 따른 세라티아 속(*Serratia* sp.) DM1 균주(KCTC14571BP), 이의 배양액, 이의 추출물 및 이의 무세포 상등액으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 세척용 조성물.

청구항 13

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 따른 세라티아 속(*Serratia* sp.) DM1 균주(KCTC14571BP), 이의 배양액, 이의 추출물 및 이의 무세포 상등액으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 피부 세정용 화장료 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 유류 분해능 및 바이오계면활성제 생산능을 가진 신규한 세라티아 속(*Serratia* sp.) DM1 균주 및 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 원유 또는 정제유 유래 석유계 탄화수소(Petroleum hydrocarbons, PHs)는 인간과 생태계를 위협하는 대표적인 환경오염 물질로, 특히 토양과 지하수로 유입되는 경우 생태적 기능을 심각하게 저하시키는 것으로 알려져 있다. 석유 및 LNG 등의 액체를 저장하는 지하탱크의 누출, 유조선의 해난사고 등으로 인한 기름 유출, 수송 과정 및 산업 공정에서의 배출 등으로 인해 PHs 오염이 발생한다.

[0004] 독성 및 복잡한 화학 조성을 가지는 PHs에 의해 오염된 토양의 정화 기술은 크게 물리 및 화학적 처리 또는 생물학적 처리로 구분할 수 있다. 물리 및 화학적 처리방법은 오염을 신속하게 처리할 수 있고, 추가적인 오염물질의 확산을 막을 수 있다는 장점이 있다. 그러나 물리 및 화학적 처리는 처리 과정에서 환경이 파괴될 수 있고, 막대한 에너지 및 비용이 소모되는 단점이 있어, 국민 수용성(public acceptance)이 낮은 제한점이 있다.

[0005] 생물학적 처리기술은 이러한 물리 및 화학적 정화기술의 한계를 극복할 수 있는 기술로서, 친환경적이고 경제적이며 자연경관의 심미성 증대 등과 같은 부가가치가 창출된다는 장점을 지닌다. 더불어 생물의 자연적인 대사활동에 의존하는 방법이기 때문에 투입되는 노동 및 에너지의 양이 적으며, 일반적으로 PHs를 CO_2나 H_2O로 전환시키는 완전 무기화작용(mineralization)이 촉진되기 때문에 2차 오염물질의 발생 문제가 없다.

[0006] 상기 생물학적 처리기술은 오염물질의 분해를 담당하는 미생물의 외부공급 여부에 따라 생물 자극법(영양분 및 전자수용체 공급, (Biostimulation))과 생물증대법(미생물 공급, (Bioaugmentation))으로 분류할 수 있다. 생물 자극법은 영양 염류와 산소를 공급하여 오염 토양 내에 존재하는 토착미생물을 활성화시켜 오염물질 분해를 유도하는 것으로서, 생물증대법에 비하여 처리시간이 길며 이에 소요되는 비용도 대체적으로 높은 편이다. 반면 생물증대법은 유류 분해능을 가진 미생물을 직접 오염현장에 주입함으로써 처리시간을 단축시킬 수 있다.

[0007] 따라서 상기 생물증대법에 활용될 수 있는 우수한 유류 분해능을 가진 미생물의 발굴이 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명자들은 신규한 세라티아 속 균주를 분리하고, 이의 디젤 및 윤활유 분해능과 바이오계면활성제(biosurfactant) 생산능을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0010] 따라서 본 발명의 목적은 신규한 세라티아 속(*Serratia* sp.) 균주를 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 유류 오염 정화용 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 유류 오염 정화 방법을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 바이오계면활성제(biosurfactant) 생산용 미생물 제제를 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 바이오계면활성제 생산 방법을 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 또 다른 목적은 바이오계면활성제를 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명의 또 다른 목적은 세척용 조성물을 제공하는 것이다.

[0017] 본 발명의 또 다른 목적은 피부 세정용 화장료 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0019] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 세라티아 속(*Serratia* sp.) DM1 균주(KCTC14571BP)를 제공한다.

[0020] 또한 상기 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 세라티아 속(*Serratia* sp.) DM1 균주(KCTC14571BP)를 유효성분으로 포함하는, 유류 오염 정화용 조성물을 제공한다.

[0021] 또한 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 세라티아 속(*Serratia* sp.) DM1 균주(KCTC14571BP)를 유류 오염원에 처리하는 단계를 포함하는, 유류 오염 정화 방법을 제공한다.

[0022] 또한 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 세라티아 속(*Serratia* sp.) DM1 균주(KCTC14571BP)를 유효성분으로 포함하는 바이오계면활성제(biosurfactant) 생산용 미생물 제제를 제공한다.

[0023] 또한 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 세라티아 속(*Serratia* sp.) DM1 균주(KCTC14571BP)를 배양하는 단계를 포함하는 바이오계면활성제 생산 방법을 제공한다.

[0024] 또한 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 세라티아 속(*Serratia* sp.) DM1 균주(KCTC14571BP), 이의 배양액, 이의 추출물 및 이의 무세포 상등액으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 바이오계면활성제를 제공한다.

[0025] 또한 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 세라티아 속(*Serratia* sp.) DM1 균주(KCTC14571BP), 이의 배양액, 이의 추출물 및 이의 무세포 상등액으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상을 유효성분으로 포

함하는 세척용 조성물을 제공한다.

[0026] 또한 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 세라티아 속(*Serratia* sp.) DM1 균주(KCTC14571BP), 이의 배양액, 이의 추출물 및 이의 무세포 상등액으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 피부 세정용 화장료 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0028] 본 발명은 신규한 세라티아 속 DM1 균주 및 이의 활성에 대한 것으로, 본 발명에 따른 신규한 세라티아 속 DM1 균주는 우수한 디젤 분해능 및 바이오계면활성제 생산능을 보유한 바, 2차 오염물질의 발생 문제없이 석유계 탄화수소(Petroleum hydrocarbons, PHs)에 의한 오염 정화 방법에 활용될 수 있을 뿐만 아니라, 상기 균주로부터 생산된 바이오계면활성제는 계면활성제를 사용하는 다양한 산업에 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0030] 도 1은 본 발명에 따른 세라티아 속 DM1 균주의 디젤 분해능을 확인한 결과이다.

도 2는 본 발명에 따른 세라티아 속 DM1 균주의 C10 내지 C28의 탄화수소 화합물에 대한 분해능을 확인한 결과이다.

도 3은 본 발명에 따른 세라티아 속 DM1 균주의 윤활유 분해능 확인에 있어서, 17일동안 모니터링한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031] 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.

[0032] 본 발명은 세라티아 속(*Serratia* sp.) DM1 균주(KCTC14571BP)를 제공한다.

[0033] 상기 세라티아 속 DM1 균주는 본 발명자들에 의해 새로이 동정된 미생물로서, 우수한 유류 분해능을 가지고 있어, 생물학적인 방법으로 효과적으로 유류 오염 정화 방법에 유용하게 활용할 있는 미생물이다.

[0034] 본 발명자들은 디젤에 오염된 토양에서 배양한 옥수수 근권 토양 유래 토양 농화배양액으로부터 디젤 분해능이 현저히 우수한 균주를 분리하고 상기 균체의 DNA를 추출해 동정한 결과, 세라티아 속의 신규 균주임을 확인하였으며, 이를 DM1 균주라 명명하였다. 본 발명의 발명자들은 상기 세라티아 속 DM1 균주를 2021년 05월 18일자로 생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)에 기탁하여 기탁번호 KCTC14571BP를 부여받았다.

[0035] 본 발명의 일실시예에 따르면, 본 발명에 따른 세라티아 속 DM1 균주는 5일 동안 90%의 디젤 분해능 및 188.38 mg-TPH · g dry cell weight^{-1} · $^{-1}$의 디젤 분해 속도를 보여주었다.

[0036] 더불어 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 세라티아 속 DM1 균주는 58일동안 윤활유 분해에 있어서, 배양액 내 잔류 TPH 농도 5,639 mg-TPH · L^{-1} 및 57%의 윤활유 제거 효율을 보여주었다.

[0037] 또한 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 세라티아 속 DM1 균주는 탄소수 10 내지 22개를 가지는 탄화수소 화합물에 대하여 높은 제거 효율을 보여주었다.

[0038] 또한 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면 본 발명의 세라티아 속 DM1 균주는 혈액에 대하여 용혈을 야기하고, 소수성이며, 리파아제(lipase) 효소를 포함하는 바이오계면활성제를 생산하는 것을 확인하였다.

[0039] 현재 기름 유출시 석유 탄화수소 처리를 위하여 화학 성분의 합성 계면활성제가 사용되며, 이는 탄화수소의 유화를 가능하게 하여 용해도를 높이고 오일 분해 미생물에 의한 후속 분해를 촉진한다. 하지만 상기 합성 계면활성제는 독성과 낮은 생분해성의 문제점으로 인해 해양 환경에서 널리 사용되지 못한다. 따라서 바이오계면활성제는 상기와 같은 합성 계면활성제의 문제점을 극복하여 다양한 오염원에서 사용할 수 있다.

[0040] 그러므로 본 발명에 따른 세라티아 속 DM1 균주는 유류 분해능 및 계면활성제 생산능을 통해 석유계 탄화수소(Petroleum hydrocarbons, PHs)에 의한 오염 정화 방법에 유용하게 활용할 수 있다.

[0041] 따라서 본 발명은 세라티아 속(*Serratia* sp.) DM1 균주(KCTC14571BP)를 유효성분으로 포함하는, 유류 오염 정화

용 조성물을 제공한다.

[0042] 상기 조성물은 미생물 제제일 수 있다. 본 발명의 미생물 제제는 유효성분으로 세라티아 속 DM1 균주(KCTC14571BP) 또는 그 배양액을 함유하는 것을 특징으로 하며, 상기 균주 또는 그 배양액을 함유하기만 하면 다양한 형태로, 다양한 부형제를 첨가하여 제조될 수 있다. 즉, 미생물 제제의 제조를 위해 필요하다면 담체 등을 사용할 수 있고, 미생물의 초기 생육을 담보할 수 있는 영양원 등이 같이 첨가될 수 있다. 상기 담체는 균체 흡착, 활성유지, 환경에서의 안정화를 위해 첨가하며, 다공성, 흡착성 및 내구성이 우수한 소재를 사용할 수 있고, 영양물질은 미생물의 활성화를 위해 첨가하는 것으로 질소, 인 또는 황의 무기염류와 아연, 구리, 코발트, 셀레늄 등의 미네랄을 사용할 수 있다. 보조제는 토양 또는 수질의 pH 교정, 수분유지, 염류장해 완화 등의 목적으로 첨가하여 사용할 수 있다. 또한, 제형의 제조에 있어서 필요할 경우, 전분을 비롯한 다양한 형태의 바인더를 사용하여 펠렛 형태로 제조할 수도 있다. 미생물 제제의 제조에 관한 일반적인 사항은 당업계의 통상의 지식을 이용할 수 있음은 당업자에게 자명할 것이다.

[0043] 상기 유류는 탄소수 10개 이상의 고분자 석유계 탄화수소를 포함하는 것일 수 있으며, 디젤, 윤활유, 항공유, 휘발유, 등유, 경유, 중유 및 이들의 혼합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 석유계 유류일 수 있다.

[0044] 또한 본 발명은 세라티아 속(*Serratia* sp.) DM1 균주(KCTC14571BP)를 유류 오염원에 처리하는 단계를 포함하는, 유류 오염 정화 방법을 제공한다.

[0045] 보다 구체적으로, 본 발명에 따른 세라티아 속 DM1 균주(KCTC14571BP)를 유류로 오염된 환경에 적절하게 처리하여 오염을 정화시킬 수 있는데, 사용량은 오염 정도 및 대상 환경에 따라 적절하게 가감할 수 있다. 상기 유류 오염원은 토양, 강 및 지하수로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 예를 들어 상기 유류 오염원이 토양일 경우, 총 석유탄화수소농도로 5,000 내지 30,000 mg/kg 평균 오염도를 가진 유류 오염 토양에 대하여, 오염 토양 1kg 당 DM1 균주 농도가 약 10^8 내지 10^{10} CFU가 되도록 처리하여 사용하는 것이 바람직하다.

[0046] 투여 방법은 특별한 제한은 없으나, 넓은 면적의 오염원에 적용될 경우 소방차, 헬리콥터 등을 이용하여 골고루 살포할 수 있고, 좁은 면적의 오염원에는 분무기 등을 이용하여 골고루 살포할 수 있다. 오염원이 토양일 경우, 살포 후에는 정기적으로 경작기를 이용하여 토양층을 뒤집어주는 경작법 등을 추가로 수행하여 정화처리할 수 있다.

[0047] 본 발명의 세라티아 속 DM1 균주를 이용한 유류 오염 정화 방법에 있어서, 상기 유류 오염원이 디젤에 의하여 오염된 오염원인 경우 디젤의 농도는 7,000 내지 15,000 mg/L인 것이 바람직하며, 10,000 mg/L의 농도가 보다 바람직하다. 본 발명의 일실시예에 따르면, 본 발명의 세라티아 속 DM1 균주는 디젤 오염농도 10,000 mg/L일 때 가장 빠른 디젤 분해속도를 보여주었다.

[0048] 더불어 상기 오염원이 토양인 경우 디젤의 농도는 7,000 내지 15,000 mg/kg-soil인 것이 바람직하며, 10,000 mg/kg-soil의 농도가 보다 바람직하다. 또한 디젤 분해를 위한 세라티아 속 DM1 균주의 배양 온도는 30 내지 37 ℃인 것이 바람직하며, 30℃인 것이 보다 바람직하다.

[0049] 더불어 본 발명은 본 발명에 따른 세라티아 속 DM1 균주(KCTC14571BP)를 유효성분으로 포함하는, 바이오계면활성제(biosurfactant) 생산용 미생물 제제를 제공한다.

[0050] 상기 미생물 제제는 유효성분으로 세라티아 속 DM1 균주(KCTC14571BP) 또는 그 배양액을 함유하는 것을 특징으로 하며, 상기 균주 또는 그 배양액을 함유하기만 하면 다양한 형태로, 다양한 부형제를 첨가하여 제조될 수 있다.

[0051] 본 발명에 있어서, 상기 "계면활성제(surfactant)"는 한 분자 내에 친수성기(hydrophilic)와 소수성기(hydrophobic)를 모두 갖는 양친매성 물질(amphipathic compound)을 의미한다. 표면이나 계면의 성질을 변화시켜 표면장력을 감소시키는 물질로서 서로 다른 성질을 지닌 물(극성)과 기름(비극성)이 섞일 수 있도록 두 경계면에 흡착해 성질을 변화시키는 역할을 수행하는 물질이다.

[0052] 산업적으로 흔히 사용되는 합성 계면활성제는 대부분 원유에서 얻어지는데, 이에 비해 바이오계면활성제(biosurfactant)는 박테리아, 효모와 같은 미생물과 효소에서 생합성하여 얻어진다. 따라서 자연 그대로의 물질로 생산되기 때문에 자극성과 독성이 적은 편이며 생분해도가 뛰어난 장점을 지니고 있다. 그리고 고온 및 염도, pH에 대한 효율성이 높고 합성하기가 용이하며 분자 부피가 커서 화학 계면활성제와는 달리 다양한 표면

활성을 지닌다는 장점도 있다. 그밖에 화학합성 계면활성제에 비해 다양한 화학적 구조를 지니고 있어 선택성을 높일 수 있는 점도를 들수 있는데 이는 바이오계면활성제의 가장 큰 특징으로 손꼽을 수 있다.

[0053] 또한 본 발명은 세라티아 속(*Serratia* sp.) DM1 균주(KCTC14571BP)를 배양하는 단계를 포함하는 바이오계면활성제 생산 방법을 제공한다.

[0054] 본 발명의 균주를 배양하는 방법은 당업계에 통상적으로 이용되는 방법을 이용할 수 있다. 상기 바이오계면활성제 생산 균주의 배양 및 바이오계면활성제 생산을 위한 배지는 예를 들어, MSM 배지, YM 배지, LB 배지, TSA(Trypticase Soy Agar) 배지, BHI (Brain heart infusion) 배지, TBS (Tris-Buffered Saline) 배지, SD(Sabouraud Dextrose) 배지 및 MRS (de Man, Rogosa and Sharpe) 배지 등을 사용할 수 있으며, 균주의 증식에 유해한 영향을 미치지 않고, 정상적인 바이오계면활성제 생산을 유도하는 배지라면 사용에 제한되지 않는다.

[0055] 또한, 상기 바이오계면활성제 생산 균주의 배양은 미생물 배양에 사용되는 통상의 조건을 사용하는 어떠한 방법도 사용할 수 있다. 바람직하게는 균주의 배양은 증류수 1L에 대하여, 황산 마그네슘($MgSO_4$) 0.1 내지 1g, 인산수소이나트륨(Na_2HPO_4) 10 내지 25g, 인산이수소칼륨(KH_2PO_4) 1 내지 10g, 염화나트륨(NaCl) 0.1 내지 1g. 염화칼슘(CaCl) 0.009 내지 0.05g, 염화암모늄(NH_4Cl) 0.05g 내지 3g을 포함하는 MSM 액체배지에 균주를 접종하고 디젤(1%, v/v)을 주입한 후 30 내지 37℃에서 5일 내지 10일동안 진탕배양하여 수행할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0056] 또한 본 발명은 본 발명에 따른 세라티아 속 DM1 균주(KCTC14571BP), 이의 배양액, 이의 추출물 및 이의 무세포 상등액으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 바이오계면활성제를 제공한다.

[0057] 상기 바이오계면활성제는 리파아제(lipase) 효소를 포함하는 계면활성제인 것을 특징으로 한다.

[0058] 본 발명에 있어서, "배양액"은 상기 균주를 적합한 배지에서 배양한 배양액 자체, 상기 배양액을 여과 또는 원심분리하여 균주를 제거한 여액(여과액, 원심분리한 상등액, 상기 여액을 농축한 농축액, 배양액을 초음파 처리하거나 상기 배양액에 라이소자임(Lysozyme)을 처리하여 수득한 세포 파쇄액, 상기 균주를 배양한 다음 수득한 산물 등이 제한 없이 포함된다. 상기 배양액의 조성은 통상의 세라티아 속 균주 배양에 필요한 성분뿐 아니라, 세라티아 속 균주의 생장에 상승적으로 작용하는 성분을 추가적으로 포함할 수 있으며, 이에 따른 조성은 당업계의 통상의 기술을 가진 자에 의하여 용이하게 선택될 수 있다.

[0059] 본 발명에 있어서, "무세포 상등액(Cell Free Supernatant)"은 균주를 배양한 후 이를 원심분리하고 필터를 이용하여 여과한 세포를 제거한 순수 액체를 지칭한다. 상기 무세포 상등액은 균주를 배양한 후 이를 원심분리하고 필터를 이용하여 여과한 액체를 지칭한다. 본 발명의 바이오계면활성제는 상기 세라티아 속 DM1 균주(KCTC14571BP), 균주의 배양액, 균주의 무세포 상등액, 이의 농축물, 이의 추출물 또는 이를 건조한 것을 제한 없이 포함할 수 있으며, 건조방법으로는 통풍건조, 자연건조, 분무건조 및 동결건조가 가능하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0060] 또한 본 발명은 본 발명에 따른 세라티아 속(Serratia sp.) DM1 균주(KCTC14571BP), 이의 배양액, 이의 추출물 및 이의 무세포 상등액으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 세척용 조성물을 제공한다.

[0061] 또한 본 발명은 본 발명에 따른 세라티아 속(Serratia sp.) DM1 균주(KCTC14571BP), 이의 배양액, 이의 추출물 및 이의 무세포 상등액으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 피부 세정용 화장료 조성물을 제공한다.

[0062] 상기 본 발명에 따른 세라티아 속(Serratia sp.) DM1 균주(KCTC14571BP), 이의 배양액, 이의 추출물 및 이의 무세포 상등액으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상은 용액 또는 다른 형태로 조성물에 첨가될 수 있다. 또한, 세척 능력에 유해한 영향을 미치지 않는 범위 내에서 적합한 부형제 (carrier) 또는 담체를 추가로 포함할 수 있다. 부형제는 본 발명의 바이오계면활성제와 조합되는 화합물, 성분 또는 구조를 의미하고, 조성물의 제조를 돕거나 용이하게 하고, 저장, 투여, 전달, 효능, 선택성, 또는 의도된 용도 또는 목적을 위한 다른 형태를 가질 수 있다. 즉, 부형제는 활성 성분의 분해를 최소화하고 추가의 부작용을 최소화하기 위해 선택될 수 있다. 바람직한 예의 수성 및 비수성 부형제, 희석제, 용매는 물, 에탄올, 폴리올 (프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 글리세롤 등), 식물성 오일 및 이들의 적절한 혼합물을 포함한다. 상기 세척용 조성물은 세탁 비누, 부엌용 세제 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0063] 본 발명에 따른 화장료 조성물은 활성성분으로서 본 발명에 따른 세라티아 속(Serratia sp.) DM1 균주(KCTC14571BP), 이의 배양액, 이의 추출물 및 이의 무세포 상등액으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상에 화장품학 및/또는 피부학적으로 허용 가능한 부형제를 추가로 함유함으로써, 당업계에 공지된 방법에 따라 국소 적용에 적합한 모든 형태의 제형으로 제조될 수 있다. 예를 들면, 이에 한정되지는 않으나 본 발명에 따른 화장료 조성물은 용액, 겔, 고체, 에멀전, 현탁액, 마이크로에멀전, 마이크로캡슐, 미세과립구, 이온형 및/또는 비이온형 소낭 분산제, 크림, 스프레이 또는 스틱의 형태로 제조될 수 있다. 본 발명의 화장료 조성물에 함유되는 상기 본 발명에 따른 세라티아 속(Serratia sp.) DM1 균주(KCTC14571BP), 이의 배양액, 이의 추출물 및 이의 무세포 상등액으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 함량은 이에 한정되지 않지만 전체 조성물 총 중량에 대하여 0.01 내지 50 중량%인 것이 바람직하고, 0.1 내지 30 중량%인 것이 더욱 바람직하다.

[0064] 본 발명의 화장료 조성물은 활성 성분에 대한 희석제, 분산제 또는 담체로서 작용하는 피부학적으로(또는 미용학적으로, 화장품학적으로) 허용 가능한 부형제를 포함한다. 부형제는 피부 관리 제품에 통상적으로 사용되는 물질, 예컨대 물, 액상 또는 고상연화제(피부연화제), 실리콘 기름, 유화제, 용매, 습윤제, 증점제, 분말, 추진제, 피부침투 증강제, 착색제, 방향제, 농후제 등을 포함할 수 있다.

[0065] 구체적으로, 상기 피부 연화제는 피부의 연화, 진정, 코팅, 매끄럽게 하거나 또는 촉촉하게 하기 위해 사용한다. 본 발명에서 피부 연화제는 당업계에 공지된 모든 종류를 사용할 수 있으며 이에 제한되지 않으나, 예를 들어, 석유 기제, 지방산 에스테르, 알킬 에톡실레이트, 지방산 에스테르 에톡실레이트, 지방 알코올, 폴리실록산 또는 이의 혼합물일 수 있다. 이외에 프로필렌 글리콜, 부틸렌 글리콜, 글리세린, 트리에틸렌 글리콜, 경랍, 왁스, 지방산, 지방 알코올 에테르, 글리세라이드, 아세토글리세라이드, 에톡실화 글리세라이드, 폴리하이드록시 알코올의 다른 지방산 에스테르, 라놀린 및 이의 유도체와 같은 통상적인 피부 연화제를 포함한다. 상기 유화제는 화장료 조성물의 수상과 유상이 혼합되도록 하는 역할을 한다. 상기 유화제는 1종 이상을 임의로 함유할 수 있으며 비이온성, 음이온성 또는 양이온성을 모두 포함할 수 있다. 상기 유화제의 종류는 에멀전의 형태가 유중수 분산형인지 수중유 분산형인지에 따라 결정할 수 있다. 적합한 유화제의 예로는 이에 한정되지는 않으나, 솔비탄 트리올레이트, 솔비탄 트리스테아레이트, 글리세롤 모노올레이트, 글리세롤 모노스테아레이트, 글리세롤 모노라우레이트, 솔비탄 세스퀴올레이트, 솔비탄 모노올레이트, 솔비탄 모노스테아레이트, 폴리옥시에틸렌 스테알릴에테르, 폴리옥시에틸렌솔비톨 밀랍 유도체, PEG 200 디라우레이트, PEG 200 모노스테아레이트, PEG 400 디올레이트, 솔비칸 모노팔미테이트, 폴리옥시에틸렌 모노스테아레이트 및 폴리옥시에틸렌 솔비탄 모노스테아레이트 등이 있다. 상기 농후제는 이에 한정되지 않으나, 가교된 카르복시폴리메틸렌 중합체, 에틸 셀룰로오스, 폴리에틸렌 글리콜, 트라칸트검, 카라야검, 산탄검, 벤토나이트, 히드록시에틸 셀룰로오스 및 히드록시프로필 셀룰로오스를 포함한다. 상기 용매로는 정제수, 알코올 또는 정제수와 알코올의 혼합물을 사용할 수 있다. 기타 임의로 사용할 수 있는 일반적인 화장품 첨가제의 예로는 이에 한정되지는 않으나, 파라-히드록시벤조에이트 에스테르와 같은 보존제, 부틸 히드록시 톨루엔, 아스코르브산 및 그 유도체 및 토코페롤 및 그 유도체와 같은 항산화제, 글리세롤, 솔비톨, 2-피롤리돈-5-카르복실레이트, 디부틸프탈레이트, 젤라틴, 폴리에틸렌 글리콜과 같은 습윤제, 아세테이트, 인산염, 시트르산염, 트리에탄올아민 및 카르보네이트와 같은 pH 완충제, 밀랍, 파라핀과 같은 왁스류, 증점제, 활성 증강제, 착색제 및 향료가 사용될 수 있다.

[0066] 이처럼 본 발명의 화장료 조성물에는 향료, 색소, 살균제, 산화방지제, 방부제 및 보습제 등을 추가로 포함할 수 있으며, 물성개선을 목적으로 점증제, 무기염류, 합성 고분자 물질 등을 포함할 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 화장료 조성물로 세안제 및 비누를 제조하는 경우에는 통상의 세안제 및 비누 베이스에 상기 본 발명에 따른 세라티아 속(Serratia sp.) DM1 균주(KCTC14571BP), 이의 배양액, 이의 추출물 및 이의 무세포 상등액으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상을 첨가하여 용이하게 제조할 수 있다. 여기에 향료, 킬레이트제, 색소, 산화방지제, 방부제 등과 물성개선을 목적으로 한 단백질, 미네랄, 비타민 등 합성 또는 천연소재를 추가로 첨가할 수 있다.

[0067] 또한, 본 발명에 따른 화장료 조성물은 본 발명에 따른 세라티아 속(Serratia sp.) DM1 균주(KCTC14571BP), 이의 배양액, 이의 추출물 및 이의 무세포 상등액으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상 외에 본 발명이 목적으로 하는 주 효과를 상승 혹은 보조할 수 있는 다른 성분들을 함유할 수도 있다.

[0069] 상술한 본 발명의 내용은 상호 모순되지 않는 한, 서로 동일하게 적용되며, 당해 기술분야의 통상의 기술자가 적절한 변경을 가해 실시하는 것 또한 본 발명의 범주에 포함된다.

[0071] 이하 본 발명을 실시예를 통해 상세하게 설명하나 본 발명의 범위가 하기 실시예로만 한정되는 것은 아니다.

[0073] **실시예 1. DM1 균주 분리**

[0074] 10,000 ppm 수준으로 디젤에 오염된 토양에서 배양한 옥수수 근권 토양 100 g을 3차 증류수에 현탁시킨 후 15분간 침전시켰다. 이 과정을 한번 더 반복한 후 상등액을 1 mm 체로 걸러 현탁액 접종원을 준비하였다. 500 mL 삼각플라스크에 멸균한 MSM(Mineral Salt Medium) 160 mL를 넣고 상기 현탁액 접종원 40 mL(20% v/v)을 주입하였다. 이후 호기성으로 30℃, 180 rpm에서 2번 반복으로 약 7일간 배양하여 농화 배양액을 제조하였다. MSM 배지는 3차 증류수 1L에 대해 다음과 같이 구성되었다: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.25 g, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 17.09g, KH_2PO_4 3 g, NaCl 0.5 g, $CaCl_2$ 0.01 g, NH_4Cl 1g. 상기 농화 배양액을 105배까지 연속희석하고 이를 LB(Luria-Bertani broth) 아가 플레이트(agar plate)에 100 μL씩 분주하여 도말하고 30℃에서 24시간 동안 배양하였다. 그 후 형성된 콜로니(colony)를 분리하여 다음과 같이 디젤 분해능을 평가하였다. 튜브에 MSM 5 mL을 넣고 상기 콜로니를 접종한 후 150 μL의 디젤(3%, v/v)를 첨가하고 30℃, 180 rpm으로 7일간 배양하였다. 이후 배양액 중의 잔류한 총석유계 탄화수소(Total Petroleum Hydrocarbons, TPH) 농도를 분석하여, 가장 디젤 분해능이 우수한 DM1 균주를 선별하였다.

[0075] 상기 TPH 농도는 다음과 같이 측정하였다: 배양액 내 잔류 디젤을 5 mL의 헥산(hexane)으로 추출한 후 GC-FID 7890N Network GC system(Agilent Technologies, CA, USA)으로 분석하였다. 이를 위하여 모세관 컬럼(capillary column (L 30 m x ID 0.320 mm x T 0.25um; HP-5 GC column, J&W Scientific, Inc., Folsom, CA, USA))을 사용하였으며 보급 가스(make up gas)로 N_2를 사용하였다. 오븐(Oven)은 3분간 60℃로 유지하였다가 4℃/min의 속도로 260℃까지 높이고, 84℃/min의 속도로 310℃까지 높여 사용하였으며 분할비(split ratio)는 25:1이었다.

[0077] **실시예 2. 세라티아 속(*Serratia* sp). DM1 균주 동정**

[0078] LB 아가 플레이트에 배양한 순수균을 100 μL 멸균수에 현탁시킨 후 95℃ 열처리한 다음, 원심분리하여 균체를 수득하는 과정을 3번 반복하여 DNA를 수득하였다. 상기 2 μL DNA 생성물(product)에 대한 48 μL의 PCR 용액(solution) 및 16s rRNA를 타겟으로 한 340F, 805R 프라이머(primer)를 이용하여 콜로니(colony) PCR을 수행하였다. 상기 PCR 용액으로 10X PCR 버퍼를 사용하였다($MgCl_2$, 1X 2.5 mM dNTPs 혼합물, 200 μM 50X SYBR, 1X의 50X ROX, 1X 10 μM 정방향(forward) 프라이머(340F), 10 μM 역방향(reverse) 프라이머(805R), 0.4 μM 5U · μL^{-1} Taq polymerase 0.025 U · μL^{-1}를 포함함). 더불어 상기 340F, 805R 프라이머에 대한 정보는 각각 다음과 같다: 5'-TCCTACGGGAGGCAGCAG-3', 5'-GACTACHVG GGTATCTAATCC-3'. 콜로니 PCR은 다음의 조건으로 수행하였다: 94℃에서 3분간 초기 변성(Initial denaturation) 후, 변성(denaturation), 어닐링(annealing), 신장(extension)의 세 단계를 각각 94℃에서 15초, 58℃에서 30초, 72℃에서 30초씩 수행하는 과정을 35 사이클(cycle) 반복하고 최종적으로 72℃에서 10분간 최종 신장(final extension) 과정으로 수행하였다.

[0079] PCR 생성물의 염기서열 분석은 마크로젠(Macrogen (서울, 한국))에 의뢰하여 수행하였다. 분석된 염기서열을 BioEdit v7.2.6.0(Bioedit Sequence Alignment Editor)프로그램을 이용해 정렬하였다. 이 후 NCBI의 Blast 프로그램을 통해 상기 염기서열을 이용하여 DM1 균주를 동정한 결과, 세라티아 속에 속하는 것으로 판단되었다.

[0080] 본 발명자들은 상기 균주를 “*Serratia* sp. DM1"으로 명명하였으며, 생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)에 2021년 05월 18일자로 기탁하여, 기탁번호 KCTC14571BP를 부여받았다.

[0082] **실시예 3. 세라티아 속 DM1 균주의 디젤 분해능 측정**

[0083] 본 발명에 따른 세라티아 속 DM1 균주의 석유계 탄화수소 분해능을 확인하기 위하여, 디젤을 사용한 TPH와 n-알칸(n-alkane) 종류별 분해율을 확인하였다.

[0084] 디젤 분해능 평가를 위해 디젤은 사용 전 160℃ 오븐에서 24 시간 고온 멸균하였다. 세라티아 속 DM1 균주는 5

mL의 LB 배지에서 30℃, 180 rpm으로 24 시간 배양한 후 100 mL의 LB 배지에 접종하여 증량했다. 이후 배양액을 새로운 튜브로 옮기고 4,000 rpm으로 5분동안 원심분리하여 균체를 수득하였다. 수득한 균체는 25 mL의 PBS(Phosphate buffer solution (pH 7.2))로 세척한 후 멸균한 MSM으로 희석하여 실험에 사용하였다. 배양액 희석액을 새로운 튜브에 0.86 mg-dry cell · 5mL-MSM^{-1}(OD600=0.39)으로 접종하였고 디젤 150 μL (3%, v/v)를 분주하여 30℃, 180 rpm에서 14일 동안 배양하였다. 14일 동안 시간 경과에 따른 잔류 디젤 농도를 평가하였으며, 실험은 3번 반복하여 수행하였다.

[0085] 배양액의 잔류 디젤은 5 mL의 헥산으로 추출하여 GC-FID로 분석하였다. 디젤 분해능 평가를 위해 0~25,000 mg-TPH · L-hexane^{-1} 범위로 검량선을 작성하였다. 배양액의 잔류 TPH 농도는 도 1에 나타내었으며, 본 발명에 따른 세라티아 속 DM1 균주의 디젤 분해율은 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0086]

시간(일)	TPH 분해 효율(%)
0	0
2	52
3	68
4	77
5	90

[0087] 그 결과, 본 발명에 따른 세라티아 속 DM1 균주를 접종한 배양액 중의 잔여 디젤 농도는 초기에 15,145 mg-TPH · L^{-1}이었다가 5일 배양 후 1,522 mg-TPH · L^{-1}로 감소함을 확인하였다(도 1 참고). 또한 5일 동안 세라티아 속 DM1 균주에 의한 디젤 분해능은 90%이었고(표 1 참고), 세라티아 속 DM1 균주에 의한 디젤 분해 속도는 188.38 mg-TPH · g dry cell weight^{-1} · h^{-1}이었다.

[0088] 더불어 탄화수소 화합물별 분해능 평가를 위하여, 탄소수가 8개인 탄화수소 C8에서 탄소수 40개를 가지는 탄화수소인 C40까지의 알칸 표준 혼합물(alkane standard mixture)인 DRH-FTRPH(AccuStandard, USA)을 이용하여 0 내지 500 mg-alkane · L-hexane^{-1} 범위로 검량선을 작성하였다. 상기 탄화수소 화합물에 따른 분해율은 도 2에 나타내었다. 도 2에 있어서, 막대 그래프는 각 탄화수소에 대한 잔류 농도(mg n-alkane · L^{-1})를 나타내며, 검정색 원은 제거율을 나타내고 빨간색 점선은 100% 제거율을 나타낸다. 또한 (a) C10: 탄소수 10개를 가지는 탄화수소에 대한 결과이고, (b) C12: 탄소수 12개를 가지는 탄화수소에 대한 결과이며, (c) C14: 탄소수 14개를 가지는 탄화수소에 대한 결과이고, (d) C16: 탄소수 16개를 가지는 탄화수소에 대한 결과이며, (e) C18: 탄소수 18개를 가지는 탄화수소에 대한 결과이고, (f) C20: 탄소수 20개를 가지는 탄화수소에 대한 결과이며, (g) C22: 탄소수 22개를 가지는 탄화수소에 대한 결과이고, (h) C24: 탄소수 24개를 가지는 탄화수소에 대한 결과이며, (i) C26: 탄소수 26개를 가지는 탄화수소에 대한 결과이고, (j) C28: 탄소수 28개를 가지는 탄화수소에 대한 결과이다.

[0089] 도 2에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 세라티아 속 DM1 균주는 탄소수 10 내지 22개를 가지는 탄화수소 화합물인 C10, C12, C14, C16, C18, C20, C22에 대해 각각 79%, 89%, 88%, 91%, 91%, 90%, 53%의 높은 제거율을 보였다. 이를 통해 본 발명의 세라티아 속 DM1 균주가 탄소수 11개 내지 16개를 주된 성분으로 하는 디젤에 대하여 높은 분해능을 가짐을 확인하였다. 또한, 세라티아 속 DM1 균주는 탄소수가 26개인 탄화수소인 C26 화합물과 탄소수가 28개인 C28를 거의 2일 내 모두 제거했고, 탄소수 24개인 C24 화합물을 5일 내 모두 제거했다. 따라서 본 발명의 세라티아 속 DM1 균주는 긴 사슬의 탄화수소 화합물도 분해할 수 있음을 확인하였다.

[0091] **실시예 4. 세라티아 속 DM1 균주의 윤활유 분해능 측정**

[0092] 본 발명에 따른 세라티아 속 DM1 균주의 다양한 석유계 탄화수소 분해능을 평가하기 위하여, 윤활유 분해능을 정성적으로 평가하였다. 이를 위하여 (주)SK 루브리컨츠(SK lubricants)의 ZIC TOP 0W-40 (PAO 100% SYNTHETIC)를 실험에 사용하였다. 윤활유는 석유계 탄화수소 물질로 탄소원자 11 내지 16개의 탄화수소를 주성분으로 하는 디젤에 비해 탄소원자 25개 이상의 높은 탄화수소의 비율이 높은 특성을 가진다. 따라서 윤활유 분해능이 있다는 것은 해당 균주가 긴 사슬의 탄화수소 화합물도 분해할 수 있음을 의미한다.

[0093] 윤활유 분해능 평가를 위해 100 mL 삼각플라스크에 20 mL의 MSM 배지를 넣고 실리스토퍼로 막아 멸균한 뒤 LB 아가 플레이트에서 배양한 세라티아 속 DM1 균주를 접종하였다. 이후 윤활유 200 μL(1% v/v)를 넣고 30℃, 200 rpm으로 배양하며 도 3과 같이 모니터링하였다. 더불어 TPH 농도를 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 측정하였다.

[0094] 모니터링 결과, 세라티아 속 DM1 균주를 접종하지 않은 대조군은 실험 기간 동안 오일층이 형성되고 동그랗게 뭉쳐 부유하거나 삼각플라스크 표면에 붙어 굳어 있었다. 또한 58일 경과 후 배양액 내 잔류 TPH 농도는 13,021 mg-TPH·L^{-1}으로 초기 오염 농도 수준으로 윤활유가 분해되지 않았음을 확인하였다.

[0095] 반면 본 발명의 세라티아 속 DM1 균주를 접종한 실험군은 배양 시간 경과에 따라 기름층이 에멀젼화되다가 17일 경과 후 오일층이 모두 사라져 투명하게 되었다. 또한 58일 경과 후 배양액 내 잔류 TPH 농도는 5,639 mg-TPH·L^{-1}로 대조군(13,021 mg-TPH·L^{-1})과 비교하여 크게 감소하였으며, 윤활유 제거 효율은 57%이었다. 따라서 본 발명에 따른 세라티아 속 DM1 균주가 윤활유 분해능을 보유하고 있음을 확인하였다.

[0096] 더불어 본 발명의 세라티아 속 DM1 균주가 윤활유를 기질로 이용하여 생장하는지 평가하기 위해 윤활유를 주입한 배양액의 현탁도를 측정하였다. LB 아가 플레이트에서 배양한 세라티아 속 DM1 균주를 100 mL LB 배지에 접종한 후 배양하였다. 상기 배양액을 원심분리하여 균체를 회수하고 이를 PBS로 세척한 다음, MSM 배지로 희석하여 실험에 사용하였다. 새로운 튜브에 희석 배양액을 최종 부피 5 mL, 최종 OD_{600} 0.116으로 접종한 후, 윤활유 50 μL(1%, v/v)를 넣고 30℃, 200 rpm에서 배양하였다. 그 결과, 배양 21일 경과 후 OD_{600}이 0.684로 초기 대비 5.9배 증가한 것을 확인하였다. 이는 실험 기간 동안 미생물이 증량했음을 의미하며, MSM 배지에 단일 탄소원으로 윤활유를 주입했으므로 본 발명에 따른 세라티아 속 DM1 균주가 윤활유를 기질로 사용하여 생장했음을 확인하였다.

[0098] **실시예 5. 세라티아 속 DM1 균주의 계면활성제 생산능 측정**

[0099] 본 발명에 따른 세라티아 속 DM1 균주의 계면활성제 생산능을 용혈 분석(Hemolysis assay), 마이크로플레이트 분석(microplate assay, 소수성(hydrophobicity)), 리파아제 분석(lipase assay)으로 정성평가하였다. 먼저 본 발명의 세라티아 속 DM1 균주를 100 mL MSM 배지에 접종하고 1 mL의 디젤(1%, v/v)을 주입한 후 30℃, 200 rpm에서 7일간 배양하여 사용하였다.

[0100] 용혈 분석은 혈액 아가 플레이트(Blood agar plate)에 세라티아 속 DM1균주 배양액을 접종하여 청정 구역(clear zone) 형성 여부로 판단하였다. 혈액 아가 플레이트는 콜롬비아 혈액 아가 베이스(Columbia blood agar base (OXOID)) 39 g을 1L 3차 증류수에 넣고 121℃로 15 분동안 멸균한 뒤 50℃까지 식혀 5% 멸균된 탈섬유화 혈액(sterile defibrinated blood)과 혼합한 후 플레이트에 분주하여 제조하였다. 상기 혈액 아가 플레이트 정중앙에 세라티아 속 DM1 균주 배양액 50 μL를 떨어뜨린 후 30℃, 37℃에서 48 시간 배양하여 청정 구역 형성여부를 확인하였다. 그 결과는 하기 표 2에 나타내었다.

[0101] 마이크로플레이트 분석은 계면활성제의 소수성을 이용한 방법으로 모눈종이 위에 마이크로플레이트를 올려두고 3차 증류수와 배양액의 굴절도 정도를 비교하여 평가했으며, 실험에는 100 μL의 3차 증류수와 세라티아 속 DM1 균주 배양액을 이용하였다. 그 결과는 하기 표 2에 나타내었다.

[0102] 리파아제 분석은 리파아제 아가 플레이트에 균을 접종하여 배양 후 청정 구역 형성 여부를 통해 평가했다. 리파아제 아가 플레이트는 다음과 같이 제조하였다: 먼저 1L 3차 증류수에 검 아라브산(gum Arabic acid) 1 g, 펩톤(peptone) 5 g, 효모 추출물(yeast extract) 1 g, 소듐 클로라이드(sodium choloride) 30 g 및 아가 15 g를 넣고 혼합하였다. 이에 트리부티린(Tributyrin) 5 g을 첨가하고 121℃, 15분동안 멸균하고 50℃로 식힌 후 플레이트에 분주하여 굳혀 제조하였다. 상기 리파아제 아가 플레이트 정중앙에 세라티아 속 DM1 균주 배양액 50 μL를 떨어뜨린 후 30℃, 37℃에서 48 시간 배양하여 청정 구역 형성 여부를 확인하였다. 그 결과는 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

[0103]

계면활성제 생상능 평가 방법	결과
용혈 분석 결과	+
마이크로플레이트 분석 결과	+

리파아제 분석 결과	+

[0104] 그 결과 상기 표 2에 나타낸 바와 같이, 본 발명에 따른 세라티아 속 DM1 균주는 용혈 분석에 있어서 30℃에서 양성 반응을 보였다. 더불어 마이크로플레이트 분석에 있어서 대조군 대비 높은 굴절율을 보이며 양성 반응을 보였다. 또한 리파아제 분석에 있어서 30℃, 37℃에서 리파아제를 형성하는 양성반응을 보였다. 따라서 본 발명의 세라티아 속 DM1 균주는 혈액에 대하여 용혈을 야기하고, 소수성이며, 리파아제 효소를 포함하는 계면활성제를 생산하는 것을 확인하였다.

[0106] **실시예 6. 세라티아 속 DM1 균주의 디젤 분해에 있어서 최적 조건 확인**

[0107] 본 발명에 따른 세라티아 속 DM1 균주의 디젤 분해에 있어서, 최적 조건을 확인하기 위하여 디젤 농도별 분해 실험을 수행하였다.

[0108] 먼저 디젤은 사용 전 160℃ 오븐에서 24 시간 고온 멸균하였으며, 디젤 5,000, 10,000, 20,000, 30,000 mg/L에 대하여 세라티아 속 DM1 균주의 분해능을 확인하였다.

[0109] 먼저 세라티아 속 DM1 균주는 5 mL의 LB 배지에 30℃, 180 rpm으로 24 시간동안 배양하고 100 mL의 LB 배지에 접종하여 계대 배양하였다. 이후 배양액을 튜브로 옮기고 4,000 rpm으로 5분동안 원심분리하여 균체를 수득하였다. 수득한 균체는 25 mL의 PBS(pH 7.2)로 세척한 후 멸균한 MSM으로 희석하여 실험에 사용하였다. 배양액 희석액을 튜브에 0.38 mg-dry cell · 5mL-MSM^{-1}(OD_{600}=0.171)으로 접종하였고 이에 30, 60.1, 120.2, 180.3 μL(5,000, 10,000, 20,000, 30,000 mg/L)의 디젤을 첨가하였다. 이를 30℃, 180 rpm으로 7일 동안 배양하며 시간 경과에 따른 잔류 디젤 농도를 확인하였다. 실험은 3반복으로 수행하였다.

[0110] 상기 배양액의 잔류 디젤 농도는 5 mL의 헥산으로 추출한 후, GC-FID로 분석하였으며, 그 결과를 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

[0111]

디젤오염농도 (mg/L)	디젤분해속도 (mg-diesel · g dry cell^{-1} · h^{-1})
5000	4418
10,000	11782
20,000	584
30,000	697

[0112] 그 결과 본 발명에 따른 세라티아 속 DM1 균주는 10,000 mg/L의 디젤 농도에서 가장 빠른 디젤 분해속도를 보여주었다.

[0114] **실시예 7. 세라티아 속 DM1 균주와 다른 세라티아 속 균주의 아산화질소 환원능 비교**

[0115] 본 발명에 따른 세라티아 속 DM1 균주와 다른 세라티아 속 균주인 세라티아 속 TF4 균주의 디젤 분해능을 확인하여 비교하였다.

[0116] 먼저 튜브에 MSM 5 mL을 넣고 LB 아가 플레이트에서 배양한 콜로니를 접종하였다. 이에 150 μL의 디젤(농도 30,000 ppm)를 첨가한 후 30℃, 180 rpm으로 4일간 배양하였다. 상기 MSM 배지는 3차 증류수 1L에 대해 다음과 같이 구성되었다: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.25 g, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 17.09g, KH_2PO_4 3g, NaCl 0.5 g, $CaCl_2$ 0.01 g, NH_4Cl 1g.

[0117] 4일 배양 후, 배양액에 잔류하는 디젤 농도를 분석하여, 본 발명의 세라티아 속 DM1 균주와 세라티아 속 TF4 균주의 디젤 분해능을 평가해 하기 표 4에 나타내었다.

표 4

[0118]

균주명	디젤 분해율(%)
세라티아 속 DM1	68
세라티아 속 TF4	39

[0119] 상기 표 4에 나타낸 바와 같이, 본 발명에 따른 세라티아 속 DM1 균주는 68%의 디젤 분해율을 보였으나, 대조군인 TF4 균주는 39%의 디젤 분해율을 보였다. 본 발명에 따른 세라티아 속 DM 균주는 대조군 균주보다 1.7배 우수한 디젤 분해율을 보임을 확인하였다.

[0120] 따라서 본 발명의 세라티아 속 DM1 균주는 다른 세라티아 속 균주 대비 우수한 디젤 분해능을 가짐을 확인하였다.

[0122] 종합적으로 본 발명의 실시예를 통해 본 발명의 세라티아 속 DM1 균주는 디젤, 윤활유 및 긴 사슬의 탄화수소 화합물을 분해할 수 있는 바, 우수한 유류 분해능을 보유하고 있음을 확인하였고, 더불어 바이오계면활성제 생산능을 보유한 것을 확인한 바, 본 발명에 따른 세라티아 속 DM1 균주는 유류 오염 정화 또는 계면활성제를 사용하는 다양한 산업에 유용하게 활용될 수 있다.

수탁번호

[0124]

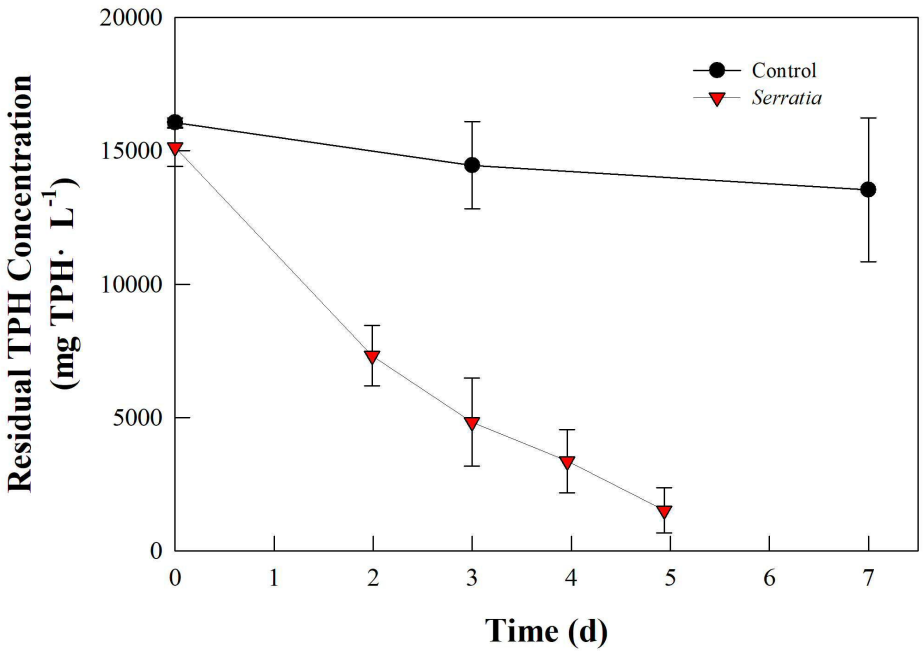
기탁기관명 : 생명공학연구원 생물자원센터

수탁번호 : KCTC14571BP

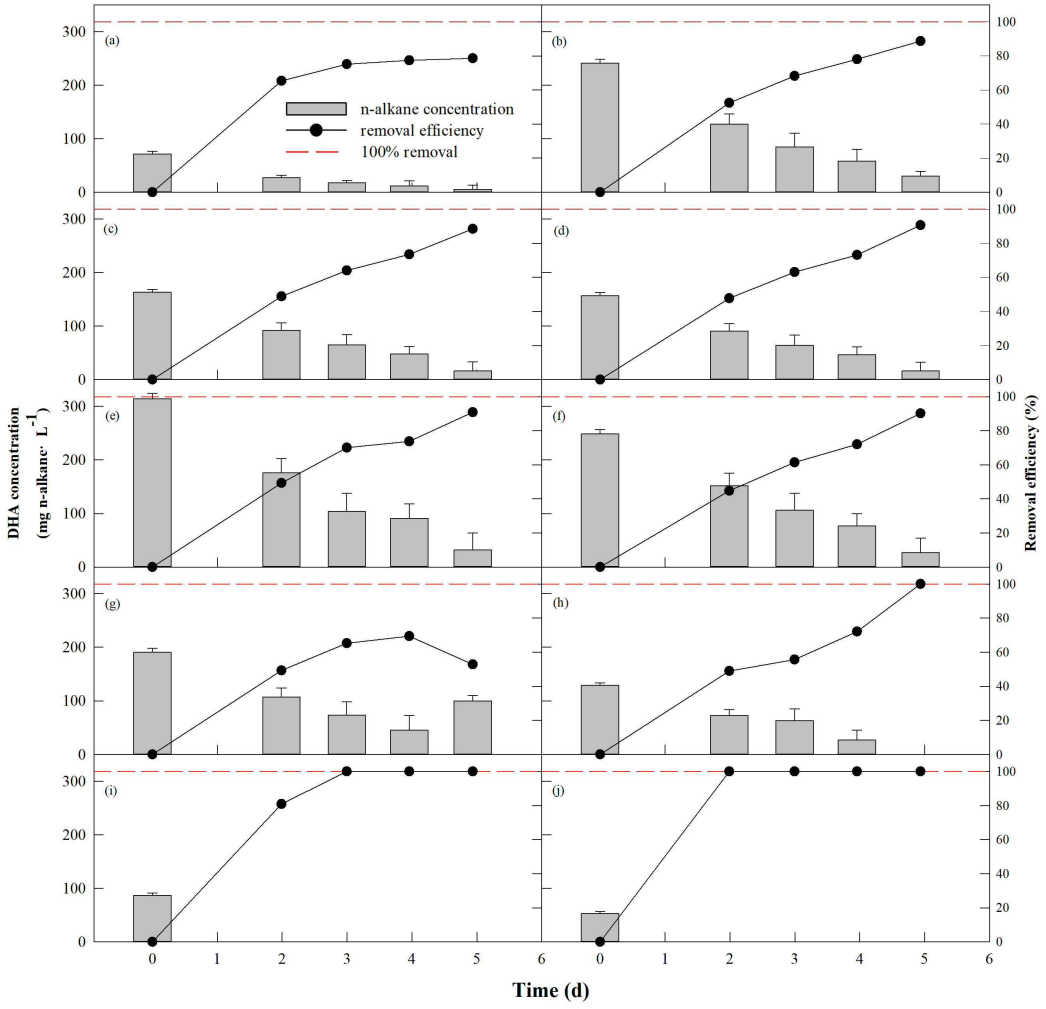
수탁일자 : 20210518

도면

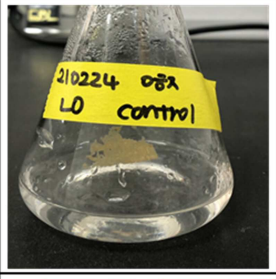
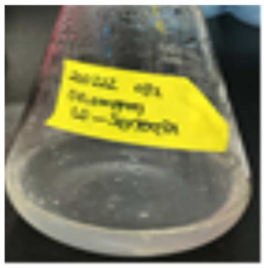
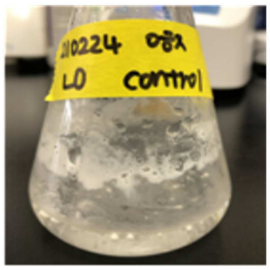
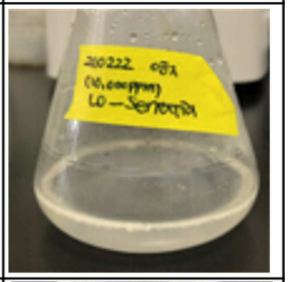
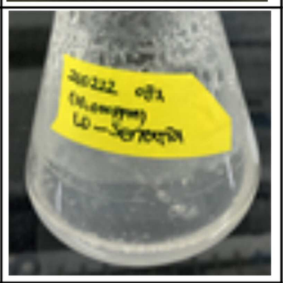
도면1



도면2


(a)
(b)
(c)
(d)
(e)
(f)
(g)
(h)
(i)
(j)
n-alkane concentration
removal efficiency
100% removal
DHA concentration (mg n-alkane· L-1)
Removal efficiency (%)
Time (d)

도면3

Time (d)	control	*Serratia* sp. DM1
0		
3		
10		
17	