

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2024년 2월 8일 (08.02.2024)



(10) 국제공개번호
WO 2024/029976 A1

- (51) 국제특허분류:
C12N 1/20 (2006.01) B09B 3/60 (2022.01)
C08J 11/10 (2006.01) C12R 1/39 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2023/011455
- (22) 국제출원일: 2023년 8월 4일 (04.08.2023)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2022-0098026 2022년 8월 5일 (05.08.2022) KR
- (71) 출원인: 전남대학교 산학협력단 (INDUSTRY FOUNDATION OF CHONNAM NATIONAL UNIVERSITY)
[KR/KR]: 61186 광주광역시 북구 용봉로 77, Gwangju (KR).
- (72) 발명자: 염수진 (YEOM, Soo Jin); 61182 광주광역시 북구 용주로30번길 60, 105-1103, Gwangju (KR). 윤철호

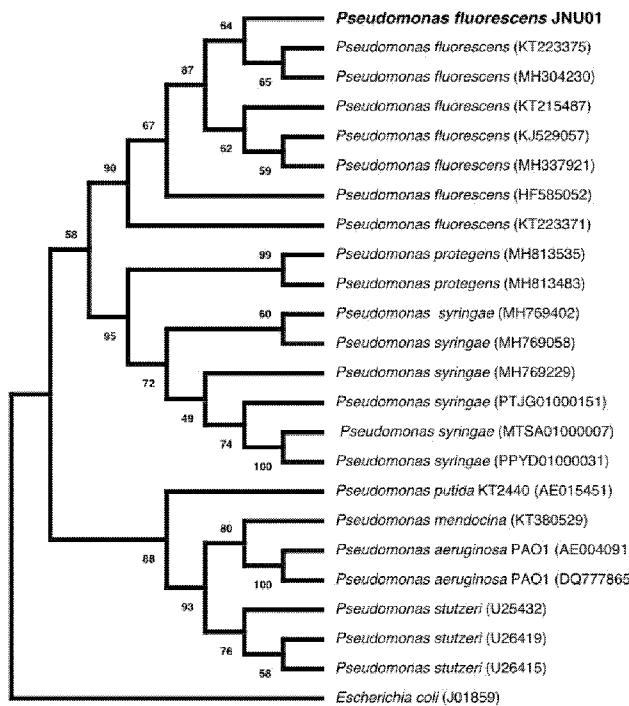
(YUN, Chul Ho); 30152 세종특별자치시 대평로 80, 610-1101, Sejong (KR). 지원석 (CHI, Won Seok); 61040 광주광역시 북구 양일로305번길 11, 101동 702호, Gwangju (KR). 박춘구 (PARK, Chun Goo); 58125 전라남도 화순군 화순읍 광덕로 165, 102동 1106호, Jeollanam-do (KR). 김예빈 (KIM, Ye Bin); 61174 광주광역시 북구 면앙로31번길 7, 210-508, Gwangju (KR). 천성민 (CHEON, Seong Min); 03082 서울특별시 종로구 대학로5가길 15, 302호, Seoul (KR).

(74) 대리인: 특허법인 피씨알 (PCR INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM); 06158 서울특별시 강남구 테헤란로 441, 10층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH,

(54) Title: NOVEL MICROORGANISM WITH PLASTIC DECOMPOSITION ACTIVITY AND USES THEREOF

(54) 발명의 명칭: 플라스틱 분해 활성을 갖는 신규 미생물 및 이의 용도



(57) Abstract: The present invention relates to a strain of *Pseudomonas fluorescens* JNU01 (Accession number: KCTC14430BP) having plastic decomposition activity. The strain of *Pseudomonas fluorescens* JNU01 according to the present invention can decompose plastics when cultured in a medium containing plastic, and can therefore be used in a pretreatment process for plastic recycling.

(57) 요약서: 본 발명은 플라스틱 분해활성을 가지는 슈도모나스 플루오르센스 JNU01 (*Pseudomonas fluorescens* JNU01) (수탁번호: KCTC14430BP) 균주에 관한 것으로, 본 발명에 따른 슈도모나스 플루오르센스 JNU01 (*Pseudomonas fluorescens* JNU01) 균주는 플라스틱을 포함하는 배지에서 배양하면 플라스틱을 분해할 수 있으므로, 플라스틱 재활용을 위한 전처리 과정에 사용될 수 있다.

KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서와 별도로 규칙 13의2에 의하여 제출한 기탁된 생물학적 물질에 관한 표시와 함께 (규칙 13의2.4(d)(i) 및 48.2(a)(viii))

명세서

발명의 명칭: 플라스틱 분해 활성을 갖는 신규 미생물 및 이의 용도 기술분야

[1] 본 발명은 플라스틱 분해 활성을 갖는 신규 미생물 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경기술

[2] 플라스틱(Plastic)이란, 열 또는 압력에 의하여 성형할 수 있는 유기물 기반 고분자 물질 및 그 혼합물을 이르는 것이다. 플라스틱은 가벼우면서도 강하고, 어떤 모양으로도 쉽게 만들 수 있고, 무엇이든 담을 수 있으며, 심지어 수명도 길고 값도 저렴하여 우리가 일상생활에 널리 사용하는 필름, 합성섬유, 병, 튜브, 장난감에서 고내열, 고강도 재료에 이르기까지 다양한 용도로 사용된다. 플라스틱 사용량이 증가함에 따라 플라스틱 생산량 또한 연평균 4%씩 증가하여 연간 약 4톤에 이르는 플라스틱이 생산되고 있다.

[3] 또한, 코로나 팬데믹 사태로 인해 의료용 폐기물의 증가, 일회용품 사용의 증가, 마스크 사용의 증가 등으로 플라스틱 사용량이 기존보다 눈에 띄게 늘어났다. 2015년 기준 대한민국의 플라스틱 소비량은 1인당 132.7kg으로 세계 3위를 기록했으며 지난 10년간 생활 폐플라스틱 발생량이 2009년 188 만톤에서 2018년 323 만톤으로 72% 증가하였다. 2010년 기준 전국 매립지는 229개소로 매립지 사용기한이 끝난 이후 새로운 매립지 선정에 있어 주민 간의 반발이 클 것으로 예상된다. 플라스틱을 폐기하는 방법에 소각, 매립 등이 있으나 화학적으로 분해하는 경우 환경과 인체에 영향을 미치는 다이옥신 등의 방향족 물질들이 생성되고 매립 이후 부패 과정에서 침출수가 발생해 토양 및 수질 오염이 야기될 수 있으므로 폐플라스틱 분해 방법에 대한 새로운 대안이 필요하다. 미생물을 사용하여 분해할 경우 미생물이 탄소원으로 플라스틱을 사용하므로 친환경적이며 인체에도 해롭지 않다는 장점이 있다. 그러나 플라스틱을 탄소원으로 활용할 수 있는 미생물은 매우 제한적이며 알려진 종이 적고 플라스틱 소모량도 매우 적다는 문제점이 있다.

[4] 최근 한국, 중국, 칠레, 영국 등 4개 연구팀에서 새롭게 발견된 PET 분해 효소의 3차원 입체구조를 규명하고, 돌연변이 실험을 통해 효소 활성 및 안정성을 높이기 위한 연구를 진행 중이며 상용화를 목표로 개발에 박차를 가하고 있다. 또한 나일론, 폴리에스터 분해 효소도 초기 연구가 진행되었으나, 플라스틱 문제의 주범인 폴리에틸렌(PE), 폴리프로필렌(PP), 폴리스티렌(PS)은 세균과 곰팡이, 애벌레 등이 생물학적 분해를 할 수 있다는 현상만 보고되어 있으며 정확한 분해 기작은 아직 보고되지 않고 있다.

[5] 이에 본 발명자들은 슈도모나스 플루오레센스(*Pseudomonas fluorescens*)종에서 보유 효소 차이에 따라 폴리에틸렌 분해능이 달라짐을 확인하였고 관련 효소(알

케인 모노옥시게나아제)가 폴리에틸렌과 반응하여 폴리에틸렌에 화학적 변화를 이끌어 낸 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[6]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[7] 일 양상은 플라스틱 분해활성을 가지는 슈도모나스 플루오르센스 JNU01 (*Pseudomonas fluorescens* JNU01)를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[8] 다른 양상은 슈도모나스 플루오르센스 JNU01 (*Pseudomonas fluorescens* JNU01) 균주를 플라스틱이 포함된 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 플라스틱 분해 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[9]

과제 해결 수단

[10] 일 양상은 플라스틱 분해활성을 가지는 슈도모나스 플루오르센스 JNU01 (*Pseudomonas fluorescens* JNU01) (수탁번호: KCTC14430BP) 균주를 제공하는 것이다.

[11] 일 구체예에 따르면, 상기 플라스틱은 PET (Polyethylene terephthalate), PVC (Polyvinyl chloride), PS (Polystyrene), PP (Polypropylene) 및 PE (Polyethylene) 중 하나 이상인 것일 수 있다. 예를 들면, PE (Polyethylene) 일 수 있다.

[12] 일 구체예에 따르면, 상기 슈도모나스 플루오르센스 JNU01 (*Pseudomonas fluorescens* JNU01) 균주는 플라스틱을 탄소원으로 사용하여 생장이 가능한 것일 수 있다.

[13] 일 구체예에 따르면, 탄소원은 미생물이 사용하여 생장할 수 있는 유기 자원으로서 상기 탄소원은 탄화수소일 수 있으며, 구체적으로는 일산화탄소, 이산화탄소, 에틸렌, 메틸렌, 프로필렌일 수 있으며, 보다 구체적으로는 에틸렌일 수 있다.

[14] 일 구체예에 따르면, 상기 슈도모나스 플루오르센스 JNU01 (*Pseudomonas fluorescens* JNU01) 균주는 플라스틱을 탄소원으로 소비하여 생장할 때 하이드록실기가 증가하는 것일 수 있으며, 보다 구체적으로 플라스틱을 탄소원으로 소비하여 생장할 때 산소를 첨가하는 것일 수 있다.

[15] 일 실시예에서, 상기 슈도모나스 플루오르센스 JNU01 (*Pseudomonas fluorescens* JNU01) 균주는 폴리에틸렌(PE)의 농도가 10 mg/mL 내지 50 mg/ml, 30mg/ml 내지 50mg/ml 일 때 균주가 생장하는 것을 확인하였다.

[16] 다른 양상은 슈도모나스 플루오르센스 JNU01 (*Pseudomonas fluorescens* JNU01) 균주를 플라스틱이 포함된 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 플라스틱 분해 방법을 제공하는 것이다.

[17] 일 구체예에 따르면, 상기 플라스틱은 PET (Polyethylene terephthalate), PVC (Polyvinyl chloride), PS (Polystyrene), PP (Polypropylene) 및 PE (Polyethylene) 중 하나 이상인 것일 수 있다.

- [18] 상기 플라스틱이 포함된 배지는 전술한 플라스틱 외에 균주의 배양에 필요한 공지의 물질을 더 포함할 수 있으나, 본 발명의 목적을 고려할 때 플라스틱 외에 다른 탄소원은 포함하지 않도록 할 수 있다.
- [19] 상기 슈도모나스 플루오르센스 JNU01 (*Pseudomonas fluorescens* JNU01) 균주는 플라스틱을 분해할 때 모노옥시게나아제를 이용하여 플라스틱을 분해하는 것일 수 있다. 보다 구체적으로는 알케인 1-모노옥시게나아제 1을 이용하는 것일 수 있다.
- [20] 상기 모노옥시게나아제는 폴리에틸렌 내에 산소를 첨가하여 분해를 유도하는 것일 수 있다.
- [21] 일 실시예에 따르면 상기 슈도모나스 플루오르센스 JNU01 (*Pseudomonas fluorescens* JNU01) 균주는 생물동화 작용(bioassimilation)과 광물 탄산화(mineralization)작용이 가능한 것일 수 있다.
- [22] 일 구체예에 따르면 상기 슈도모나스 플루오르센스 JNU01 (*Pseudomonas fluorescens* JNU01) 균주는 플라스틱을 분해하여 플라스틱의 표면을 변성시키는 것일 수 있다. 보다 구체적으로는 표면이 소수성에서 친수성으로 변화되는 것일 수 있다.
- [23] 전술한 바와 같이, 본 발명의 균주는 플라스틱, 특히 폴리에틸렌에 대한 분해능이 있기 때문에, 플라스틱이 포함된 배지에서 배양하게 되면 폴리에틸렌 표면에 위치한 균주는 대사활동을 통해 폴리에틸렌의 표면에 결함(defect)을 형성한다.

[24]

발명의 효과

- [25] 본 발명에 따른 슈도모나스 플루오르센스 JNU01 (*Pseudomonas fluorescens* JNU01) 균주는 플라스틱을 포함하는 배지에서 배양하면 플라스틱을 분해할 수 있으므로, 플라스틱 재활용을 위한 전처리 과정에 사용될 수 있다.

[26]

도면의 간단한 설명

- [27] 도 1은 폴리에틸렌 분해 신규 미생물 발굴을 위한, 토양 샘플링 장소 및 스크리닝 과정 모식도를 나타낸 것이다.
- [28] 도 2는 폴리에틸렌 분해 미생물의 16s rRNA 기반 phylogenetic tree를 확인한 결과이다.
- [29] 도 3은 폴리에틸렌을 유일 탄소원으로 하여 다양한 농도에서 미생물의 생장 곡선 및 배지의 탁도 증가 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [30] 도 4는 본 발명 미생물과 함께 배양한 폴리에틸렌과 대조군과 함께 배양한 폴리에틸렌의 FT-IR 비교 그래프이다.
- [31] 도 5는 본 발명 미생물의 폴리에틸렌 분해물을 확인한 결과(GC-MS)이다.
- [32] 도 6은 폴리에틸렌 분해 신규 미생물의 전장 유전체 모식도 및 모노옥시게나아제 도메인을 나타낸 것이다.

- [33] 도 7은 본 발명 균주의 모노옥시게나아제 기능 확인한 결과이다.
- [34] 도 8은 슈도모나스 플루오르센스 JNU01의 폴리에틸렌 필름 분해 결과를 전계 방출 주사 전자 현미경(FE-SEM)으로 확인한 결과이다.
- [35] 도 9는 폴리에틸렌 분해 효소 보유 유무에 따른 폴리에틸렌 농도 별 미생물 생장 곡선을 나타낸 것이다.

[36]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [37] 일 양상은 플라스틱 분해활성을 가지는 슈도모나스 플루오르센스 JNU01 (*Pseudomonas fluorescens* JNU01)를 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [38] 상기 슈도모나스 플루오르센스(*Pseudomonas fluorescens*)는 토양과 물에서 생식하는 미생물로서 호기성 미생물이며, 특정 균주는 산소 대신 질산염을 이용한 호흡을 할 수 있으며, 일반적으로 식물의 방제특성, 항식물병원성, 생분해능력을 가지고 있는 것으로 알려져 있다.
- [39] 본 발명에서는 상기 슈도모나스 플루오르센스(*Pseudomonas fluorescens*)의 동정을 진행하여 탄소원을 세포호흡에 이용하는 슈도모나스 플루오르센스 JNU01 (*Pseudomonas fluorescens* JNU01)을 동정하였으며, 슈도모나스 플루오르센스 JNU01 (*Pseudomonas fluorescens* JNU01)는 플라스틱 분해활성을 갖는다.
- [40] 상기 슈도모나스 플루오르센스(*Pseudomonas fluorescens*)는 쓰레기 매립장의 흙에서 분리한 것일 수 있다.
- [41] 다른 양상은 슈도모나스 플루오르센스 JNU01 (*Pseudomonas fluorescens* JNU01) 균주를 플라스틱이 포함된 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 플라스틱 분해 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [42] 일 양상은 플라스틱 분해활성을 가지는 슈도모나스 플루오르센스 JNU01 (*Pseudomonas fluorescens* JNU01) (수탁번호: KCTC14430BP) 균주를 제공하는 것이다.
- [43] 일 구체예에 따르면, 상기 플라스틱은 PET (Polyethylene terephthalate), PVC (Polyvinyl chloride), PS (Polystyrene), PP (Polypropylene) 및 PE (Polyethylene) 중 하나 이상인 것일 수 있다. 예를 들면, PE (Polyethylene) 일 수 있다.
- [44] 일 구체예에 따르면, 상기 슈도모나스 플루오르센스 JNU01 (*Pseudomonas fluorescens* JNU01) 균주는 플라스틱을 탄소원으로 사용하여 생장이 가능한 것일 수 있다.
- [45] 일 구체예에 따르면, 탄소원은 미생물이 사용하여 생장할 수 있는 유기 자원으로 상기 탄소원은 탄화수소일 수 있으며, 구체적으로는 일산화탄소, 이산화탄소, 에틸렌, 메틸렌, 프로필렌일 수 있으며, 보다 구체적으로는 에틸렌일 수 있다.
- [46] 일 구체예에 따르면, 상기 슈도모나스 플루오르센스 JNU01 (*Pseudomonas fluorescens* JNU01) 균주는 플라스틱을 탄소원으로 소비하여 생장할 때 하이드록

실기가 증가하는 것일 수 있으며, 보다 구체적으로 플라스틱을 탄소원으로 소비하여 생장할 때 산소를 첨가하는 것일 수 있다.

- [47] 일 실시예에서, 상기 슈도모나스 플루오르센스 JNU01 (*Pseudomonas fluorescens* JNU01) 균주는 폴리에틸렌(PE)의 농도가 10 mg/mL 내지 50 mg/ml, 30 mg/ml 내지 50mg/ml 일 때 균주가 생장하는 것을 확인하였다.
- [48] 구체적으로, 상기 폴리에틸렌의 농도가 높아질수록 슈도모나스 플루오르센스 JNU01 (*Pseudomonas fluorescens* JNU01) 균주의 생장이 증가하는 것일 수 있다.
- [49] 상기 슈도모나스 플루오르센스 JNU01 (*Pseudomonas fluorescens* JNU01)은 폴리에틸렌을 알케인의 단위로 분해하는 것일 수 있다.
- [50] 일 실시예에서 상기 슈도모나스 플루오르센스 JNU01 (*Pseudomonas fluorescens* JNU01)은 폴리에틸렌 액체 배지에서 10일 내지 50일간 성장하는 것일 수 있으며, 구체적으로는 20일 내지 40일간 성장하는 것일 수 있고, 보다 구체적으로는 30일간 성장하는 것일 수 있다.
- [51] 다른 양상은 슈도모나스 플루오르센스 JNU01 (*Pseudomonas fluorescens* JNU01) 균주를 플라스틱이 포함된 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 플라스틱 분해 방법을 제공하는 것이다.
- [52] 일 구체예에 따르면, 상기 플라스틱은 PET (Polyethylene terephthalate), PVC (Polyvinyl chloride), PS (Polystyrene), PP (Polypropylene) 및 PE (Polyethylene) 중 하나 이상인 것일 수 있다.
- [53] 상기 플라스틱이 포함된 배지는 전술한 플라스틱 외에 균주의 배양에 필요한 공지의 물질을 더 포함할 수 있으나, 본 발명의 목적을 고려할 때 플라스틱 외에 다른 탄소원은 포함하지 않도록 할 수 있다.
- [54] 상기 슈도모나스 플루오르센스 JNU01 (*Pseudomonas fluorescens* JNU01) 균주는 플라스틱을 분해할 때 모노옥시게나아제를 이용하여 플라스틱을 분해하는 것일 수 있다. 보다 구체적으로는 알케인 1-모노옥시게나아제 1을 이용하는 것일 수 있다.
- [55] 상기 모노옥시게나아제는 폴리에틸렌 내에 산소를 첨가하여 분해를 유도하는 것일 수 있다.
- [56] 일 실시예에 따르면 상기 슈도모나스 플루오르센스 JNU01 (*Pseudomonas fluorescens* JNU01) 균주는 생물동화 작용(bioassimilation)과 광물 탄산화(mineralization)작용이 가능한 것일 수 있다.
- [57] 일 구체예에 따르면 상기 슈도모나스 플루오르센스 JNU01 (*Pseudomonas fluorescens* JNU01) 균주는 플라스틱을 분해하여 플라스틱의 표면을 변성시키는 것일 수 있다. 보다 구체적으로는 표면이 소수성에서 친수성으로 변화되는 것일 수 있다.
- [58] 상기 플라스틱의 변형은 슈도모나스 플루오르센스 JNU01 (*Pseudomonas fluorescens* JNU01)가 플라스틱 분해능을 가지며, 산소를 첨가하여 플라스틱을 분해하므로 소수성인 플라스틱이 미생물에 의해 친수성으로 변하는 것이다.

[59]

[60] 전술한 바와 같이, 본 발명의 균주는 플라스틱, 특히 폴리에틸렌에 대한 분해능이 있기 때문에, 플라스틱이 포함된 배지에서 배양하게 되면 폴리에틸렌 표면에 위치한 균주는 대사활동을 통해 폴리에틸렌의 표면에 결함(defect)을 형성한다.

[61]

발명의 실시를 위한 형태

[62] 이하 하나 이상의 구체예를 실시예를 통해 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[63]

[64] 실시예1. 토양에서 미생물 분리 및 동정

[65] 대한민국 광주광역시에 위치한 쓰레기 매립장의 15m 지하의 땅에서 다양한 종류의 플라스틱과 함께 묻혀 있던 흙을 채취하였다(도 1A).

[66] 채취한 흙에서 수득한 균을 폴리에틸렌을 유일 탄소원으로 하여 제작한 폴리에틸렌 고체 배지에 평판 도말하여 미생물이 군집을 이루는 지 확인한 후 미생물의 폴리에틸렌 분해능 재검증을 위하여 각 군집을 획득해 폴리에틸렌 고체 배지에 다시 획선 도말 하였다. 이후 폴리에틸렌 액체 배지에도 미생물을 배양하여 미생물의 폴리에틸렌 분해능을 확인하였다(도 1B).

[67] 여기서 폴리에틸렌을 유일 탄소원으로 하여 제조한 액체 배지에서 분리 배양한 박테리아의 DNA에서 universal primer를 사용하여 16s rRNA 서열을 획득하였다. 그리고, SILVA 박테리아 rRNA 데이터베이스에서 슈도모나스 종의 16s rRNA 서열 정보를 활용하여 계통수를 작성하여 종 동정을 진행하였다. 박테리아 모델 생물인 *E. coli*를 outgroup으로 하여 슈도모나스 계통수를 작성한 결과 폴리에틸렌 탄소원 액체 배지에서 분리 배양한 박테리아가 슈도모나스 플루오르센스 인 것을 확인하였다(도 2).

[68] 여기서 분리된 슈도모나스 플루오르센스 JNU01 (*Pseudomonas fluorescens* JNU01)를 동정하였고, 이를 KCTC14430BP로 기탁하였다.

[69]

[70] 실험예1: 폴리에틸렌 농도별 미생물 성장 확인

[71] 실시예 1에서 분리 동정된 슈도모나스 플루오르센스 JNU01 균주가 폴리에틸렌 유일 탄소원으로 하였을 때 미생물 성장여부를 확인하였다.

[72] 구체적으로, 채취한 토양 약 5 g을 250 mL 비커에 100 mL PBS 버퍼와 혼합하고 Whatman paper (공극 크기 11 μ m)로 여과하였다. 여과된 용액은 1 g/L의 폴리에틸렌 분말을 포함한 BSM 고체 배지 플레이트에 분주하고 7일간 28°C에서 배양되었다. 폴리에틸렌 포함 배지에서 선별된 콜로니는 10, 30 또는 50 mg/ml의 폴리에틸렌을 포함한 BSM 액체 배지에 접종하였고, 폴리에틸렌 액체 배지에서 30일

간 미생물의 성장을 5일 간격으로 확인하였다. 그리고 30일간 배양한 후 배지의 탁도를 확인하였다.

- [73] 그 결과 도 3에서 확인되는 바와 같이 폴리에틸렌의 농도가 증가할 수록 일차 별 흡광도 값이 높아지는 양상을 보였으며 시각적으로 관찰되는 탁도에서도 (그래프 오른쪽의 사진) 폴리에틸렌 농도 별로 대조군 대비 실험군에서의 탁도가 증가되는 양상을 확인할 수 있었다.

[74]

[75] **실험예2: 폴리에틸렌 분해능 비교**

- [76] 본 발명의 폴리에틸렌 분해 신규 미생물과 함께 배양한 폴리에틸렌(실험군 PE, *P. fluorescens*)과 그렇지 않은 폴리에틸렌(대조군, PE)의 FT-IR 그래프를 비교하였다.

- [77] 미생물과 함께 배양한 폴리에틸렌과 그렇지 않은 폴리에틸렌을 진공오븐에서 50도에서 건조시킨 이후에 각 샘플을 FT-IR 장비를 사용하여 분석하였다. 샘플은 입자 형태로 약 5 - 10 mg을 사용하여 파장값 4000 - 400 cm^{-1} 영역에서 분해능이 4 cm^{-1} 으로 하여 16번의 스캔을 진행하였다.

- [78] 그 결과 도 4에서 확인되는 바와 같이 대조군에서보다 실험군에서 하이드록실기의 피크가 증가한 것을 확인할 수 있었으며, 이는 미생물이 폴리에틸렌을 탄소원으로 소비하여 성장할 때 폴리에틸렌을 분해하기 위하여 산소를 첨가할 것이라는 가설을 뒷받침해줄 수 있음을 확인하였다.

[79]

[80] **실험예3: 본 발명 균주의 폴리에틸렌 분해물 확인**

- [81] 본 발명의 슈도모나스 플루오르센스 JNU01이 폴리에틸렌을 분해하여 성장하였을 경우 생성되는 부산물들의 분석을 위해 미생물을 배양시키지 않은 폴리에틸렌 배지의 상층액과 미생물을 배양시킨 후의 폴리에틸렌 배지의 상층액을 GC-MS를 활용하여 분석하였다.

- [82] 미생물 배양 조건에 따라 배양 후, 배양액과 같은 부피의 에틸 아세테이트(ethyl acetate)를 사용하여 배양액 내의 화학 물질을 추출하였다. 추출된 에틸 아세테이트 층은 DB-5MS capillary column을 장착한 기체 크로마토그래피-질량분석기기(GC-MS)를 사용하여 분석되었다. 컬럼 온도는 40°C부터 280°C까지 증가시켰고 가열 속도는 10°Cmin⁻¹이며, 40°C에서 3분간, 280°C에서 4분간 온도 유지하였다. 주입부와 검사부 온도는 각각 300°C와 260°C로 고정하였다. 화학 구조의 분석은 GC-MS와 NIST/WILEY 데이터베이스를 통하여 수행되었다.

- [83] 그 결과 도 5에서 확인되는 바와 같이 미생물을 배양시키지 않은 폴리에틸렌 배지에서도 다양한 길이의 알케인들이 검출되었다. 그러나 미생물을 배양시킨 폴리에틸렌 배지에서 그렇지 않은 배지보다 더 다양한 종류의 알케인이 검출되었고 알케인의 양도 더 많은 것을 확인하였다. 이는 폴리에틸렌이 미생물이 없는 환경에서도 물리적 충격에 의하여 작은 알케인의 단위로 분해될 수 있지만 미생

물을 활용하였을 때 동일 시간 내 분해되는 폴리에틸렌의 양이 더 많고 폴리에틸렌 분해 효율이 높다는 것을 알 수 있다.

[84]

[85] **실험예4: 본 발명 균주의 전장 유전체 모식도 및 모노옥시게나아제 도메인 예측**

[86] 본 발명의 슈도모나스 플루오르센스 JNU01의 DNA를 추출하여 전장유전체 서열 정보를 두가지 염기서열 분석 방법을 통해 확보 하였다. PacBio의 장비를 이용하여 분석한 롱리드 염기서열 분석 기법과 Illumina의 장비를 이용하여 분석한 숏리드 염기서열 분석 기법을 활용하여 획득한 유전체 염기서열 조각 정보를 기반으로 전장 유전체 서열을 조립하였다. 조립된 전장 유전체 서열 정보를 기반으로 유전자 발현 부위 탐지를 위한 박테리아 유전자 동정 분석 파이프라인을 통해 슈도모나스 플루오르센스 JNU01 가 보유하고 있는 유전자위치 정보와 발현되는 단백질 서열 및 유전자 동정 정보를 확보하였다.

[87]

[88] 그 결과 도 6에서 확인되는 바와 같이 전체 6.7MB 크기의 박테리아 염기 서열 정보를 확보하였으며, 총 6000여개의 전체 유전자 정보를 확보하였다. 또한, 전체 유전자 정보 중 폴리에틸렌의 구조를 분해할 수 있는 모노옥시게나아제 목록을 확보하여 그 중 알케인 1-모노옥시게나아제 1 (Alkane 1-monooxygenase 1) 단백질의 서열 정보를 확보하였다.

[89]

[90] **실험예5: 본 발명 균주의 모노옥시게나아제 기능 확인**

[91] 실험예 4 에서 확인한 본 발명 균주의 모노옥시게나아제 기능을 확인하였다.

[92] 구체적으로 발굴한 폴리에틸렌 분해 기작의 첫번째 분해 효소인 알케인 모노옥시게나아제를 슈도모나스 플루오르센스 JNU01로부터 클로닝하여 재조합 대장균을 제작하였다.

[93] 이후 대조합 대장균 내에서 알케인 모노옥시게나아제의 단백질 과발현을 유도하였다. 대장균 내에서 알케인 모노옥시게나아제가 성공적으로 과발현 하였는지 확인하기 위해 웨스턴 블롯을 수행하였으며 음성 대조군인 pET28a(+) 벡터를 사용하여 과발현시킨 대장균 샘플에서는 밴드가 검출되지 않고 실험군인 알케인 모노옥시게나아제를 과발현시킨 대장균 샘플에서만 밴드가 검출되어 알케인 모노옥시게나아제가 재조합 대장균 내에서 성공적으로 발현한 사실을 확인하였다.

[94] 본 발명의 슈도모나스 플루오르센스 JNU01의 알케인 모노옥시게나아제가 폴리에틸렌 분해에 관여하는 것을 실험적으로 확인하기 위하여 대장균 내에서 과발현시킨 알케인 모노옥시게나아제를 추출하여 폴리에틸렌과 cell crude extract 상태로 반응시켰다.

[95] 대장균 내의 효소가 폴리에틸렌에 영향을 미치는 지 확인하기 위하여 공벡터인 pET28(+)를 사용하여 과발현시킨 대장균 세포 추출물과 폴리에틸렌을 반응시킨

샘플을 대조군으로 사용하고 폴리에틸렌이 외부 물리적 작용으로 인하여 변화하는 양상을 확인하기 위하여 효소를 첨가하지 않은 폴리에틸렌 또한 대조군으로 사용하였다.

- [96] 그 결과, 도 7에서 확인되는 바와 같이 본 발명의 슈도모나스 플루오르센스 JNU01의 알케인 모노옥시게나아제와 반응시킨 폴리에틸렌의 경우 두 가지의 대조군 모두와 비교하였을 때 하이드록실 기에서 FT-IR 피크가 증가한 양상을 확인하였다. 이는 본 발명의 슈도모나스 플루오르센스 JNU01의 알케인 모노옥시게나아제가 폴리에틸렌의 분해 효소로서 작용하여 폴리에틸렌 내에 산소를 첨가하여 분해를 유도하였음을 알 수 있다.

[97]

- [98] **실험예 6: 슈도모나스 플루오르센스 JNU01에 의해 변형된 PE 필름의 FE-SEM 및 물의 성질에 따른 접촉각 분석**

- [99] 슈도모나스 플루오르센스 JNU01을 1 mL/L의 미량 원소(trace element)용액과 PE 필름이 혼합된 10 mL 액체 BSM이 담긴 플라스크에 접종하였다. 그 후 초기 OD₆₀₀를 2로 하여 슈도모나스 플루오르센스 JNU01을 28°C, 200 rpm에서 30일 동안 배양했다. 30일간의 배양 후 PE 필름을 두 가지 방법으로 전처리하여 PE 필름의 투명한 표면 형태를 관찰하고 PE 필름에 부착된 박테리아를 관찰하였다.

- [100] 첫번째 방법으로 PE 필름 표면의 박테리아를 제거하기 위해 배양액에서 PE 필름을 채취하여 라커(rocker)를 사용하여 2% 소듐 도데실 설페이드(sodium dodecyl sulfate, SDS) 용액(w/v)으로 1시간 동안 세척하였다. 1시간 후에 메탄올로 PE 필름을 두 번 세척하였다.

- [101] 두번째 방법으로 PE 필름 표면에 부착된 박테리아를 관찰하기 위해 시료에 0.05 M 카코딜레이트데이트 버퍼(cacodylatedate buffer, pH 7.2)에 녹여진 2% 글루타르알데하이드(glutaraldehyde)와 2% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde)를 사용하여 고정화 작업을 수행했다. 이후 30분간 진공 건조기에서 진공 상태에서 처리해준 뒤 상온에서 4시간 고정시켰다.

- [102] 0.05 M 카코딜레이트데이트 버퍼(cacodylatedate buffer)로 시료를 30분간 세척을 3회 진행하였다. 0.05M 카코딜레이트데이트 버퍼(cacodylatedate buffer, pH 7.2)에 녹여져 있는 1% OsO₄를 사용하여 1시간 동안 흡 후드에서 고정하고, 0.05M 카코딜레이트데이트 버퍼(cacodylatedate buffer, pH 7.2)로 30분 간격으로 3회 세척하였다. 30, 50, 70, 90 및 95% 에틸 알코올을 사용하여 PE 필름을 30분 동안 탈수하였다. 이후 PE 필름을 100% 에틸 알코올로 30분 동안 두 번 탈수하였다. PE 필름은 백금(Pt)을 20 mA에서 100초 동안 스퍼터링(sputtering)하여 얇은 전도성 층을 생성하여 비전도성 고분자 샘플에 대한 명확한 상면도 이미지 관찰을 가능하게 했다.

- [103] 순수 PE 필름과 생물학적으로 분해된 PE 필름의 표면 형태는 가속 전압이 15 kV인 전계 방출 주사 전자 현미경(FE-SEM; JSM-7900F, JEOL, Tokyo, Japan)을 사용하여 관찰되었다. PE 필름의 표면 특성(소수성 또는 친수성 특성)을 결정하기

위해 물의 성질에 따른 접촉각은(water contact angle)은 PE 필름에 마이크로 주사기를 사용하여 증류수 한 방울을 점적하여 고니오미터(goniometer, Surface Tech, Senjung, Korea)를 사용하여 측정하였다.

[104] 이후, PE 필름의 물리적 변화를 확인하기 위해 미생물을 처리한 PE 필름과 미생물을 처리하지 않은 PE 필름을 FE-SEM과 물의 성질에 따른 접촉각 분석을 수행하였다. 도면 8에서 a, c, e의 경우 2000배 확대하여 촬영하였고 b, d, f의 경우 10000배 확대하여 촬영하였다.

[105] 그 결과, FE-SEM 분석에서 미생물을 처리하지 않은 PE 필름(도8 a, e)에서는 미생물이 관찰되지 않았고 미생물을 처리한 PE 필름(도8 c, f)에서는 표면에 부착된 미생물이 다수 발견됨을 확인할 수 있었다. 또한 미생물을 제거한 후 분석한 FE-SEM 결과(도8c, d)에서 미생물을 처리하지 않은 PE 필름보다 굽힘이나 균열 등과 같은 표면의 변화가 두드러지게 관찰되었다.

[106] 이러한 결과는 슈도모나스 플루오르센스 JNU01이 PE를 유일 탄소원으로 사용할 수 있고 생물 동화 작용(bioassimilation)과 광물 탄산화(mineralization)작용이 가능하다는 것을 보여준다.

[107] 미생물을 처리하지 않은 PE 필름과 미생물을 처리한 PE 필름을 물의 성질에 따른 접촉각측정으로 각 필름의 표면 특성을 확인한 결과 미생물을 처리하지 않은 PE 필름은 접촉각 79.19° , 미생물을 처리한 PE 필름은 접촉각 49.91° 를 보여 미생물을 처리한 PE 필름이 미생물과의 반응을 통해 표면이 소수성에서 친수성으로 변화된 것을 확인할 수 있었습니다(도8).

[108]

[109]

[110] **실험예 7: 폴리에틸렌 분해 효소 보유 유무에 따른 폴리에틸렌 농도 별 미생물 성장 확인**

[111] 폴리에틸렌 분해 효소 보유 유무에 따른 폴리에틸렌 농도 별 미생물 성장을 확인하였다.

[112] 구체적으로, 알케인 모노옥시게나아제를 보유하지 않은 슈도모나스 플루오르센스인 DR133을 JNU01과 동일 조건에서 폴리에틸렌 액체 배지에서 폴리에틸렌 농도 별로 배양하였다.

[113] 그 결과 도 9에서 확인되는 바와 같이 알케인 모노옥시게나아제를 보유하지 않은 DR133이 성장 초기 단계에서 JNU01보다 느린 성장 속도를 확인하였다. 이는 알케인 모노옥시게나아제가 폴리에틸렌 분해에 관여하여 폴리에틸렌을 탄소원으로 활용하는 미생물의 성장을 돕고 폴리에틸렌 분해 효율을 증대시킴을 의미하나 폴리에틸렌 액체 배지에서 DR133 또한 성장하였으므로 현재까지 예측하고 있는 폴리에틸렌 분해 기작 이외에 다른 방식의 분해 기작이 존재할 수 있음을 알 수 있다.

[114]

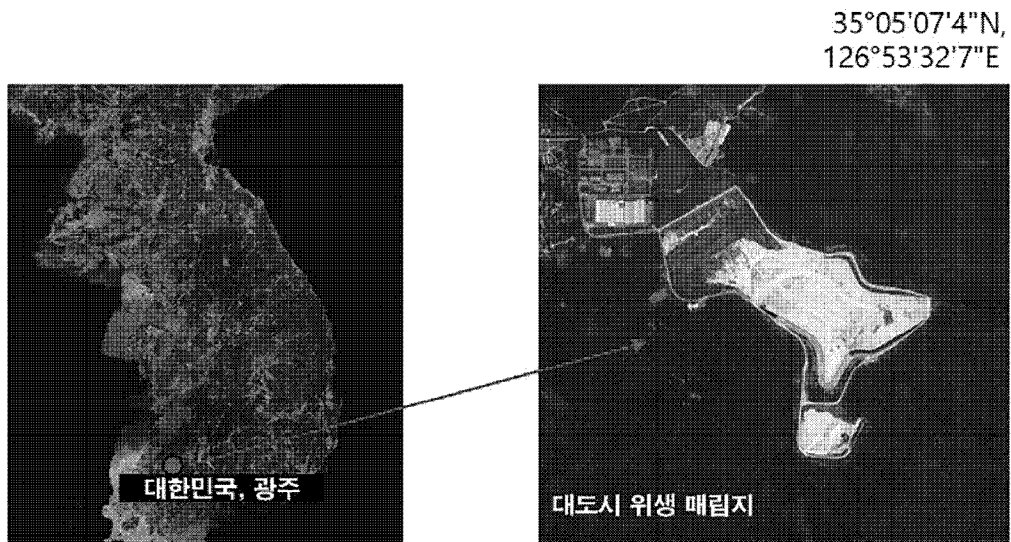
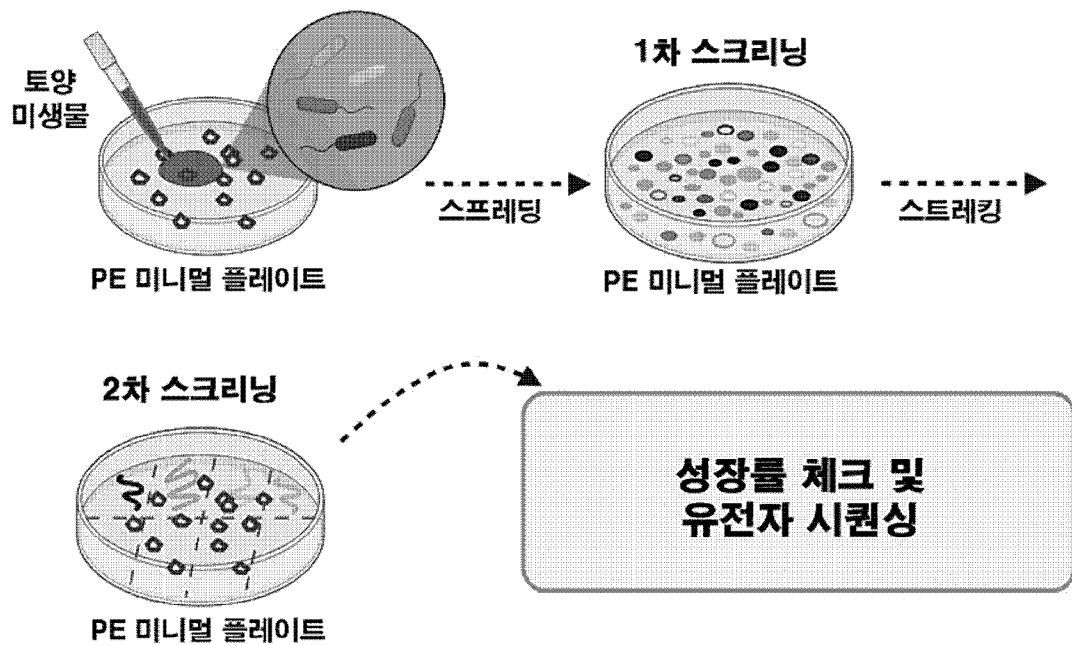
산업상 이용가능성

- [115] 슈도모나스 플루오르센스 JNU01 균주는 플라스틱을 포함하는 배지에서 배양하면 플라스틱을 분해할 수 있으므로, 플라스틱 재활용을 위한 전처리 과정에 사용될 수 있으며, 재활용이 어려운 플라스틱의 경우 소각이나 매장이 아닌 분해를 통해 제거하므로 환경 친화적인 미생물 제제로 이용할 수 있다.

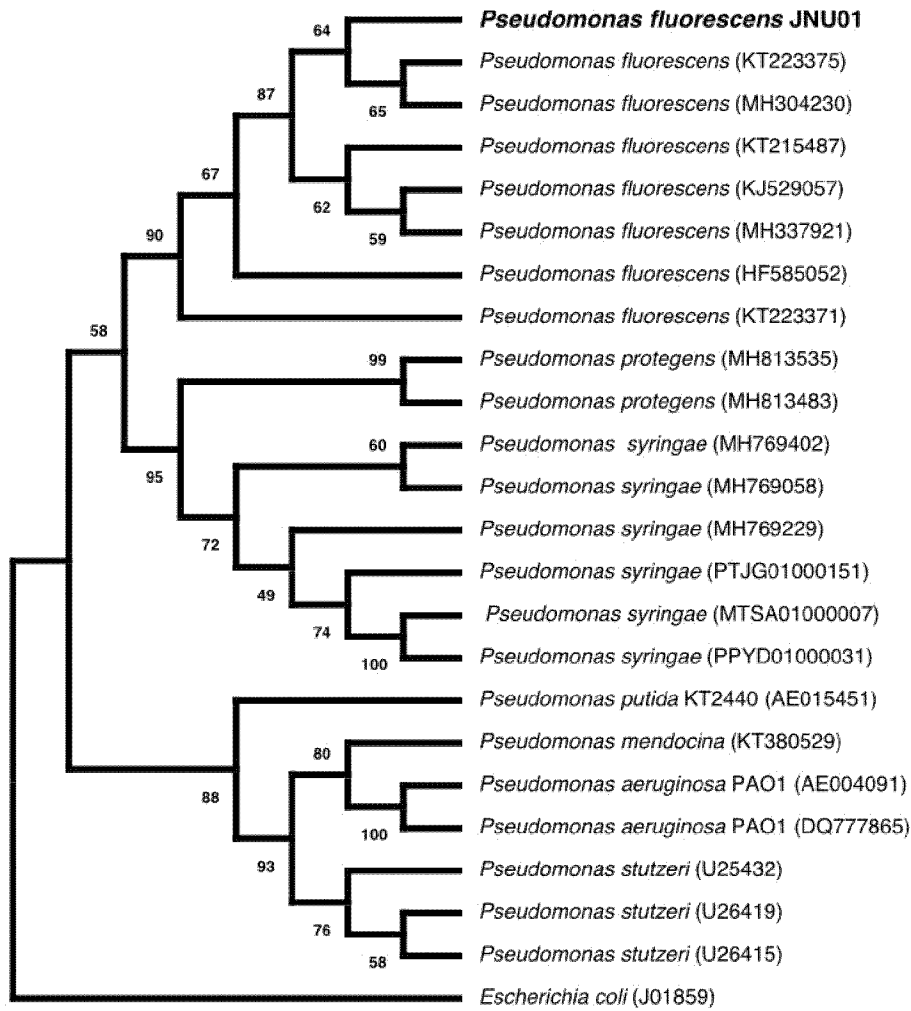
청구범위

- [청구항 1] 플라스틱 분해활성을 가지는, 수탁번호 KCTC14430BP의 슈도모나스 플루오르센스 JNU01 (*Pseudomonas fluorescens* JNU01) 균주.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서,
상기 플라스틱은 PET(Polyethylene terephthalate), PVC(Polyvinyl chloride), PS(Polystyrene), PP(Polypropylene) 및 PE(Polyethylene) 중 하나 이상인 것인,
슈도모나스 플루오르센스 JNU01 (*Pseudomonas fluorescens* JNU01)균주.
- [청구항 3] 제 1항에 있어서,
상기 슈도모나스 플루오르센스 JNU01 (*Pseudomonas fluorescens* JNU01) 균주는 플라스틱을 탄소원으로 사용하여 생장이 가능한 것인,
슈도모나스 플루오르센스 JNU01 (*Pseudomonas fluorescens* JNU01)균주.
- [청구항 4] 제 1항의 균주를 플라스틱이 포함된 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 플라스틱 분해방법.
- [청구항 5] 제 4항에 있어서,
상기 플라스틱은 PET(Polyethylene terephthalate), PVC(Polyvinyl chloride), PS(Polystyrene), PP(Polypropylene) 및 PE(Polyethylene) 중 하나 이상인 것인,
플라스틱 분해방법.

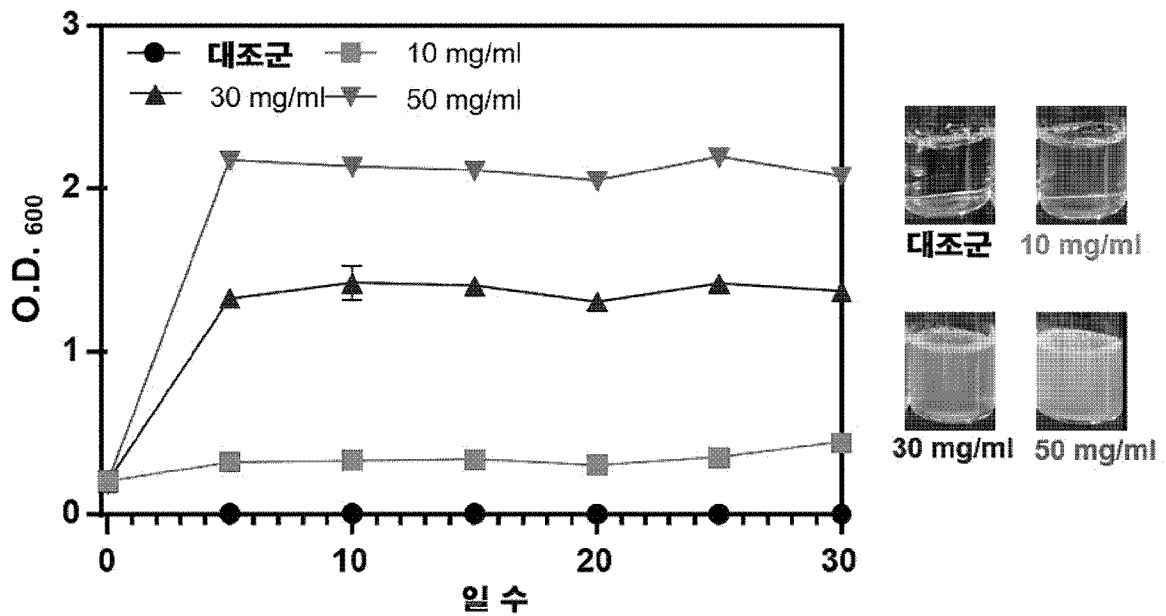
[도1]

A.**B.**

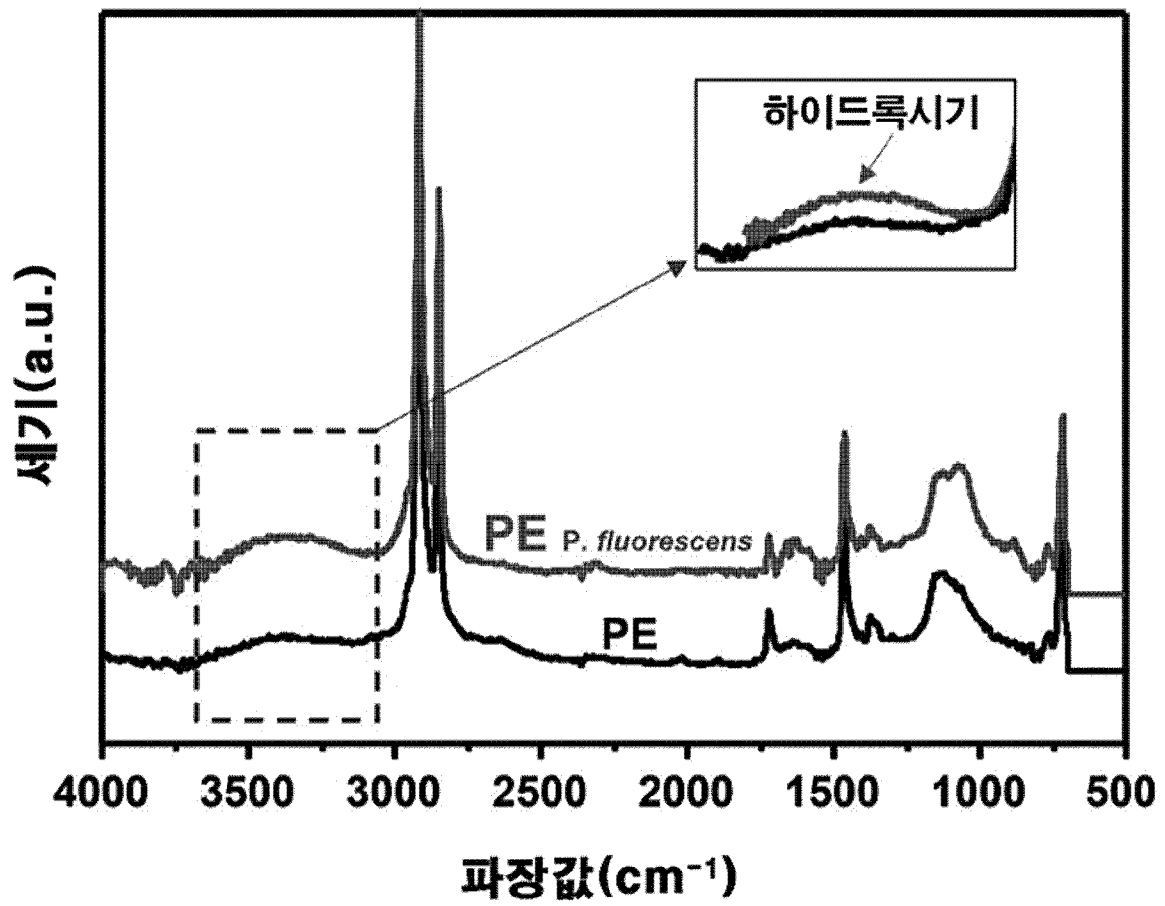
[도2]



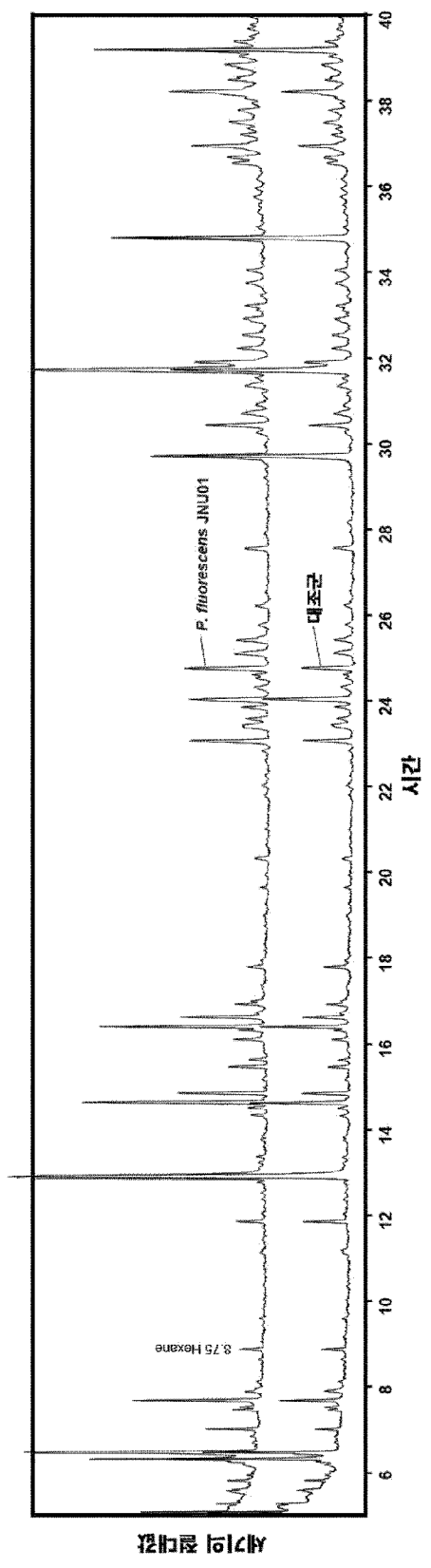
[도3]



[도4]

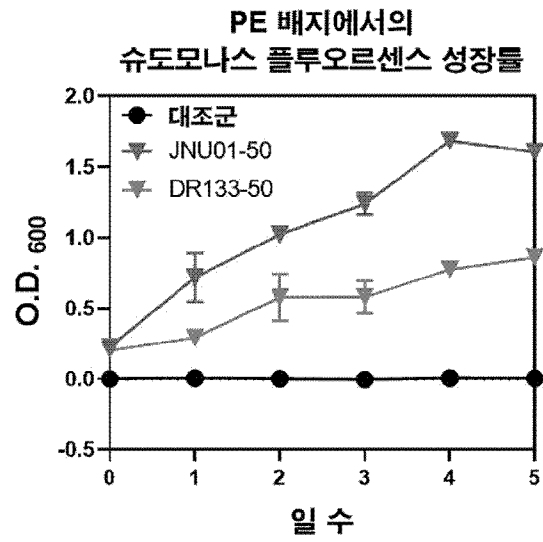
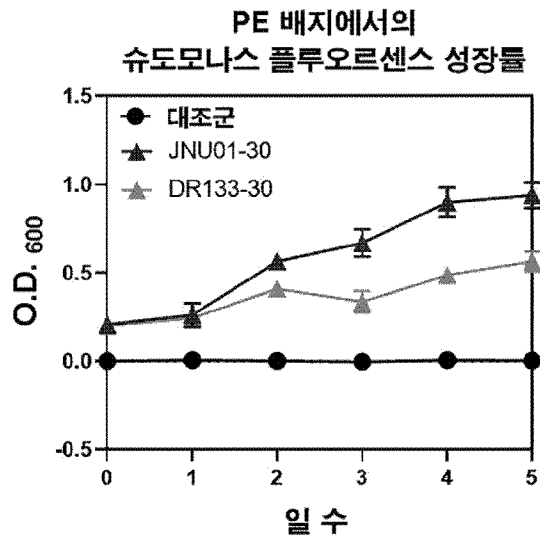


[도5]



[illegible]

[도9]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/011455

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 1/20(2006.01)i; C08J 11/10(2006.01)i; B09B 3/60(2022.01)i; C12R 1/39(2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 1/20(2006.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above

Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 플라스틱 분해(plastic degradation), 슈도모나스 플루오르센스 JNU01(Pseudomonas fluorescens JNU01), 알케인 모노옥시게나아제(alkane monooxygenase)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JAYASHREE LAKSHMI, P. et al. Genetic analysis of low-density polyethylene degrading bacteria from plastic dump sites. Indian Journal of Science and Technology. 2020, vol. 13, no. 48, pp. 4732-4738. See abstract; pages 4732-4734; and tables 2 and 3.	1-5
A	HUSSEIN, Amal A. et al. Optimum conditions for LDPE strips biodegradation by local bacterial isolates. J. Int. Environmental Application & Science. 2015, vol. 10, no. 4, pp. 399-407. See entire document.	1-5
A	PATIL, R. C. Screening and characterization of plastic degrading bacteria from garbage soil. British Journal of Environmental Sciences. December 2018, vol. 6, no. 4, pp. 33-40. See entire document.	1-5
A	WILKES, R.A. et al. Degradation and metabolism of synthetic plastics and associated products by Pseudomonas sp.: capabilities and challenges. Journal of Applied Microbiology. 2017, vol. 123, pp. 582-593. See entire document.	1-5



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“D” document cited by the applicant in the international application

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

07 November 2023

Date of mailing of the international search report

08 November 2023

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/011455

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	KIM, Ye-Bin et al. Functional genomic analysis of polyethylene biodegradable bacteria. 2023 한국생물공학회 춘계 학술발표대회 및 국제심포지엄 (2023 KSBB Spring Meeting and International Symposium). 12-14 April 2023. See page 368.	1-5

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 1/20(2006.01)i; C08J 11/10(2006.01)i; B09B 3/60(2022.01)i; C12R 1/39(2006.01)n		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 1/20(2006.01) 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 플라스틱 분해(plastic degradation), 슈도모나스 플루오르센스 JNU01 (Pseudomonas fluorescens JNU01), 알케인 모노옥시게나아제(alkane monooxygenase)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	JAYASHREE LAKSHMI, P. 등, "Genetic analysis of low-density polyethylene degrading bacteria from plastic dump sites", Indian Journal of Science and Technology, 2020, 13권, 48호, 페이지 4732-4738 요약; 페이지 4732-4734; 및 표 2, 3 참조.	1-5
A	HUSSEIN, AMAL A. 등, "Optimum conditions for LDPE strips biodegradation by local bacterial isolates", J. Int. Environmental Application & Science, 2015, 10권, 4호, 페이지 399-407 전체 문헌 참조.	1-5
A	PATIL, R. C., "Screening and characterization of plastic degrading bacteria from garbage soil", British Journal of Environmental Sciences, 2018.12, 6권, 4호, 페이지 33-40 전체 문헌 참조.	1-5
A	WILKES, R.A. 등, "Degradation and metabolism of synthetic plastics and associated products by Pseudomonas sp.: capabilities and challenges", Journal of Applied Microbiology, 2017, 123권, 페이지 582-593 전체 문헌 참조.	1-5
PX	KIM, YE-BIN 등, "Functional genomic analysis of polyethylene biodegradable bacteria", 2023 한국생물공학회 춘계학술발표대회 및 국제심포지엄, 2023.04.12-14 페이지 368 참조.	1-5
☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☐ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2023년11월07일(07.11.2023)		국제조사보고서 발송일 2023년11월08일(08.11.2023)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373