(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0126707
(43) 공개일자 2024년08월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/50 (2017.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/5014 (2013.01)
G01N 33/5044 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0019528
(22) 출원일자 2023년02월14일
심사청구일자 2023년02월14일

(71) 출원인
조선대학교산학협력단
광주광역시 동구 조선대길 126(서석동, 산학협력단)
(72) 발명자
방일수
광주광역시 동구 조선대길 7 (서석동)
김미라
광주광역시 북구 첨단연신로 166 (신용동, 광주첨단2지구사랑으로부영)
(74) 대리인
특허법인(유)남아이피그룹, 특허법인 남앤남

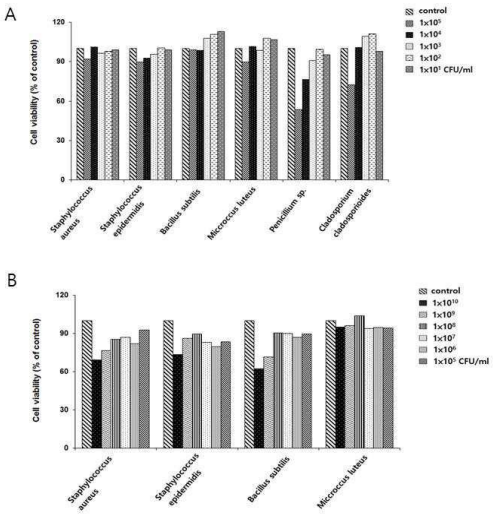
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **실내 공기 중의 생물유해인자를 스크리닝하는 방법**

(57) 요 약

본 발명은 실내 공기 중의 생물유해인자를 스크리닝하는 방법에 관한 것으로, 구체적으로 본 발명은 인체로부터 분리된 구강상피세포, 폐세포 또는 장상피세포에 실내공기에 존재하는 세균 또는 곰팡이를 처리하여 배양한 후, 상기 세포의 세포독성을 분석하는 단계를 포함하는 실내 공기 중의 생물유해인자를 스크리닝하는 방법 및 (1) 실내 공기를 흡입시켜 채취한 후 배지에 충돌시켜 공기 중의 총 부유미생물을 포집하는 단계; (2) 포집된 부유미생물을 배지에 접종하고 배양한 후 동정하는 단계; 및 (3) 동정한 부유미생물이 상기 스크리닝 방법으로 동정된 실내 공기 중의 생물유해인자에 해당되는지를 판단하는 단계를 포함하는 생물유해인자에 의한 실내 공기오염 여부를 분석하는 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1485018633
과제번호	ARQ202101648002
부처명	환경부
과제관리(전문)기관명	한국환경산업기술원
연구사업명	실내공기생물학적위해인자관리기술개발사업
연구과제명	실내공기 생물 유해인자에 의한 세포 및 생물체 반응 평가를 위한 다각적 모델링 기법 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	조선대학교 산학협력단
연구기간	2021.04.01 ~ 2025.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

인체로부터 분리된 구강상피세포, 폐세포 또는 장상피세포에 실내공기에 존재하는 세균 또는 곰팡이를 처리하여 배양한 후, 상기 세포의 세포독성을 분석하는 단계를 포함하는,

실내 공기 중의 생물유해인자를 스크리닝하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 세균 또는 곰팡이는 $1x10^{1}$~$1x10^{10}$의 CFU/ml의 농도로 처리하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 배양은 24~48시간 동안 수행하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 세포독성은 MTT 어세이 또는 LDH 어세이로 수행하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 구강상피세포는 YD38 세포주이고, 상기 폐세포주는 MRC5 세포주이고, 상기 장상피세포는 HeLa 세포주인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 세균 또는 곰팡이를 처리하지 않은 대조군을 기준으로, 세균 또는 곰팡이를 처리한 세포의 생존률이 70% 미만인 경우, 세포독성이 있는 것으로 판단하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

Acinetobacter johnsonii, *Acinetobacter pittii*, *Agrococcus baldri*, *Arthrobacter bussei*, *Bacillus aerius*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus proteolyticus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus wiedmannii*, *Brachybacterium paraconglomeratum*, *Brevundimonas bullata*, *Brevundimonas diminuta*, *Brevundimonas vesicularis*, *Chryseobacterium gwangjuense*, *Chryseobacterium taihuense*, *Corynebacterium glutamicum*, *Exiguobacterium acetylicum*, *Kocuria carniphila*, *Kocuria marina*, *Kocuria rosea*, *Kocuria salsicia*, *Leucobacter chromiiresistens*, *Lysinibacillus parviboronicapiens*, *Mammaliicoccus sciuri*, *Massilia agri*, *Massilia haematophila*, *Microbacterium oxydans*, *Micrococcus yunnanensis*, *Moraxella osloensis*, *Nocardia globerula*, *Paenibacillus terrigena*, *Planomicrobium okeanokoites*, *Priestia megaterium*, *Pseudarthrobacter oxydans*, *Pseudomonas parafulva*, *Pseudomonas straminea*, *Rhodococcus biphenylivorans* 및 *Roseomonas mucosa* 으로 이루어진 군 중에서 선택되는 세균은 구강상피세포, 폐세포 및 장상피세포 모두에 대해 세포독성을 나타내어 70% 미만의 세포 생존률을 보이는 생물유해인자로 판단하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제6항에 있어서,

Microbacterium testaceum, *Micrococcus aloeverae*, *Neomicrococcus lactis* 및 *Pseudarthrobacter sulfonivorans* 으로 이루어진 군 중에서 선택되는 세균은 구강상피세포, 폐세포 및 장상피세포 모두에 대해 세포독성을 나타내지 않아, 상기 세균은 대조군 균종으로 판단하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제6항에 있어서,

Alternaria alternata, *Arthrinium camelliae-sinensis*, *Fusarium fujikuroi*, *Fusarium incarnatum*, *Microdochium albescens*, *Neurospora tetrasperma*, *Penicillium glabrum*, *Penicillium sclerotiorum*, *Phanerochaete sordida* 및 *Trichoderma harzianum* 으로 이루어진 군 중에서 선택되는 곰팡이는 구강상피세포, 폐세포 및 장상피세포 모두에 대해 세포독성을 나타내어 70% 미만의 세포 생존률을 보이는 생물유해인자로 판단하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제6항에 있어서,

Aspergillus niger, *Bjerkandera adusta*, *Cladosporium cladosporioides*, *Hypocrea lutea*, *Moesziomyces aphidis*, *Penicillium rolfsii*, *Rhodotorula dairenensis* 및 *Rhodotorula glutinis* 으로 이루어진 군 중에서 선택되는 곰팡이는 구강상피세포, 폐세포 및 장상피세포 모두에 대해 세포독성을 나타내지 않아, 상기 세균은 대조군 균종으로 판단하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

(1) 실내 공기를 흡입시켜 채취한 후 배지에 충돌시켜 공기 중의 총 부유미생물을 포집하는 단계;

(2) 포집된 부유미생물을 배지에 접종하고 배양한 후 동정하는 단계; 및

(3) 동정한 부유미생물이 *Acinetobacter johnsonii*, *Acinetobacter pittii*, *Agrococcus baldri*, *Arthrobacter bussei*, *Bacillus aerius*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus proteolyticus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus wiedmannii*, *Brachybacterium paraconglomeratum*, *Brevundimonas bullata*, *Brevundimonas diminuta*, *Brevundimonas vesicularis*, *Chryseobacterium gwangjuense*, *Chryseobacterium taihuense*, *Corynebacterium glutamicum*, *Exiguobacterium acetylicum*, *Kocuria carniphila*, *Kocuria marina*, *Kocuria rosea*, *Kocuria salsicia*, *Leucobacter chromiiresistens*, *Lysinibacillus parviboronicapiens*, *Mammaliicoccus sciuri*, *Massilia agri*, *Massilia haematophila*, *Microbacterium oxydans*, *Micrococcus yunnanensis*, *Moraxella osloensis*, *Nocardia globerula*, *Paenibacillus terrigena*, *Planomicrobium okeanokoites*, *Priestia megaterium*, *Pseudarthrobacter oxydans*, *Pseudomonas parafulva*, *Pseudomonas straminea*, *Rhodococcus biphenylivorans* 및 *Roseomonas mucosa* 으로 이루어진 군 중에서 선택되는 세균에 해당되는지를 판단하는 단계를 포함하는,

생물유해인자에 의한 실내 공기오염 여부를 분석하는 방법.

청구항 12

(1) 실내 공기를 흡입시켜 채취한 후 배지에 충돌시켜 공기 중의 총 부유미생물을 포집하는 단계;

(2) 포집된 부유미생물을 배지에 접종하고 배양한 후 동정하는 단계; 및

(3) 동정한 부유미생물이 *Alternaria alternata*, *Arthrinium camelliae-sinensis*, *Fusarium fujikuroi*, *Fusarium incarnatum*, *Microdochium albescens*, *Neurospora tetrasperma*, *Penicillium glabrum*, *Penicillium sclerotiorum*, *Phanerochaete sordida* 및 *Trichoderma harzianum* 으로 이루어진 군 중에서 선택되는 곰팡이에 해당되는지를 판단하는 단계를 포함하는,

생물유해인자에 의한 실내 공기오염 여부를 분석하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 실내 공기 중의 인체 유해한 세균 및 곰팡이를 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 현대인들은 건물 내에서 대부분의 시간을 보내기 때문에 실내공기질은 도시민의 건강에 직접적인 영향을 줄 수 있다. 즉, 한정된 공간 속에서 인공적인 설비를 통하여 계속적으로 순환되는 오염된 공기에 노출되거나, 환기설비가 없는 밀폐된 공간에서 오랫동안 생활함으로써 각종 인체 유해 오염물질들을 흡입하게 됨으로써 각종 호흡기 관련 질환에 시달리고 있는 현대인이 증가하고 있다.

[0003] 최근 실내 환경문제가 국민건강의 주요 이슈로 부각되면서 주요 오염물질에 대한 실시간 관리의 필요성이 대두되고 있으며, 특히, 경제적 수준과 과학의 발달로 다양한 생활용품, 건축 내장재 등으로부터 다양한 오염물질이 방출되는 등 실내공간에서 생활하는 거주자들로부터 빌딩 증후군 증상을 호소하는 사례가 증가하고 있다.

[0004] 이렇게 실내 환경은 인체의 건강에 중요한 영향을 미치는 요인이 되었고, 근래 들어 호흡기 환자의 증가로 인해 실내 공기 중의 미생물 독성 연구의 필요성이 대두되고 있으나, 이에 대한 연구가 미비한 실정이다.

[0005] 이에 본 발명자들은 실내 공기에 존재하는 생물유해인자들을 스크리닝하였고, 생물유해인자들이 세포 또는 생물체에 미치는 영향을 분석함으로써, 실내 공기 중의 생물유해인자 세포독성실험의 표준화를 구축할 수 있는 체계를 확립하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 10-2308883

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 따라서 본 발명의 목적은 인체로부터 분리된 구강상피세포, 폐세포 또는 장상피세포에 실내공기에 존재하는 세균 또는 곰팡이를 처리하여 배양한 후, 상기 세포의 세포독성을 분석하는 단계를 포함하는, 실내 공기 중의 생물유해인자를 스크리닝하는 방법을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 본 발명의 방법으로 스크리닝된 실내 공기 중의 생물유해인자를 이용하여 생물유해인자에 의한 실내 공기오염 여부를 분석하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 인체로부터 분리된 구강상피세포, 폐세포 또는 장상피세포에 실내공기에 존재하는 세균 또는 곰팡이를 처리하여 배양한 후, 상기 세포의 세포독성을 분석하는 단계를 포함하는, 실내 공기 중의 생물유해인자를 스크리닝하는 방법을 제공한다.

[0010] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 세균 또는 곰팡이는 $1x10^{1}$~$1x10^{10}$의 CFU/ml의 농도로 처리하는 것일 수 있다.

[0011] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 배양은 24~48시간 동안 수행하는 것일 수 있다.

[0012] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 세포독성은 MTT 어세이 또는 LDH 어세이로 수행하는 것일 수 있다.

[0013] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 구강상피세포는 YD38 세포주이고, 상기 폐세포주는 MRC5 세포주이고, 상기 장상피세포는 HeLa 세포주일 수 있다.

[0014] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 세균 또는 곰팡이를 처리하지 않은 대조군을 기준으로, 세균 또는 곰팡이를

처리한 세포의 생존률이 70% 미만인 경우, 세포독성이 있는 것으로 판단하는 단계를 더 포함하는 것일 수 있다.

[0015] 본 발명의 일실시예에 있어서, *Acinetobacter johnsonii*, *Acinetobacter pittii*, *Agrococcus baldri*, *Arthrobacter bussei*, *Bacillus aerius*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus proteolyticus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus wiedmannii*, *Brachybacterium paraconglomeratum*, *Brevundimonas bullata*, *Brevundimonas diminuta*, *Brevundimonas vesicularis*, *Chryseobacterium gwangjuense*, *Chryseobacterium taihuense*, *Corynebacterium glutamicum*, *Exiguobacterium acetylicum*, *Kocuria carniphila*, *Kocuria marina*, *Kocuria rosea*, *Kocuria salsicia*, *Leucobacter chromiiresistens*, *Lysinibacillus parviboronicapiens*, *Mammaliicoccus sciuri*, *Massilia agri*, *Massilia haematophila*, *Microbacterium oxydans*, *Micrococcus yunnanensis*, *Moraxella osloensis*, *Nocardia globerula*, *Paenibacillus terrigena*, *Planomicrobium okeanokoites*, *Priestia megaterium*, *Pseudarthrobacter oxydans*, *Pseudomonas parafulva*, *Pseudomonas straminea*, *Rhodococcus biphenylivorans* 및 *Roseomonas mucosa* 으로 이루어진 군 중에서 선택되는 세균은 구강상피세포, 폐세포 및 장상피세포 모두에 대해 세포독성을 나타내어 70% 미만의 세포 생존률을 보이는 생물유해인자로 판단하는 것일 수 있다.

[0016] 본 발명의 일실시예에 있어서, *Microbacterium testaceum*, *Micrococcus aloeverae*, *Neomicrococcus lactis* 및 *Pseudarthrobacter sulfonivorans* 으로 이루어진 군 중에서 선택되는 세균은 구강상피세포, 폐세포 및 장상피세포 모두에 대해 세포독성을 나타내지 않아, 상기 세균은 대조군 균종으로 판단하는 것일 수 있다.

[0017] 본 발명의 일실시예에 있어서, *Alternaria alternata*, *Arthrinium camelliae-sinensis*, *Fusarium fujikuroi*, *Fusarium incarnatum*, *Microdochium albescens*, *Neurospora tetrasperma*, *Penicillium glabrum*, *Penicillium sclerotiorum*, *Phanerochaete sordida* 및 *Trichoderma harzianum* 으로 이루어진 군 중에서 선택되는 곰팡이는 구강상피세포, 폐세포 및 장상피세포 모두에 대해 세포독성을 나타내어 70% 미만의 세포 생존률을 보이는 생물유해인자로 판단하는 것일 수 있다.

[0018] 본 발명의 일실시예에 있어서, *Aspergillus niger*, *Bjerkandera adusta*, *Cladosporium cladosporioides*, *Hypocrea lutea*, *Moesziomyces aphidis*, *Penicillium rolfsii*, *Rhodotorula dairenensis* 및 *Rhodotorula glutinis* 으로 이루어진 군 중에서 선택되는 곰팡이는 구강상피세포, 폐세포 및 장상피세포 모두에 대해 세포독성을 나타내지 않아, 상기 세균은 대조군 균종으로 판단하는 것일 수 있다.

[0019] 또한 본 발명은, (1) 실내 공기를 흡입시켜 채취한 후 배지에 충돌시켜 공기 중의 총 부유미생물을 포집하는 단계; (2) 포집된 부유미생물을 배지에 접종하고 배양한 후 동정하는 단계; 및 (3) 동정한 부유미생물이 *Acinetobacter johnsonii*, *Acinetobacter pittii*, *Agrococcus baldri*, *Arthrobacter bussei*, *Bacillus aerius*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus proteolyticus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus wiedmannii*, *Brachybacterium paraconglomeratum*, *Brevundimonas bullata*, *Brevundimonas diminuta*, *Brevundimonas vesicularis*, *Chryseobacterium gwangjuense*, *Chryseobacterium taihuense*, *Corynebacterium glutamicum*, *Exiguobacterium acetylicum*, *Kocuria carniphila*, *Kocuria marina*, *Kocuria rosea*, *Kocuria salsicia*, *Leucobacter chromiiresistens*, *Lysinibacillus parviboronicapiens*, *Mammaliicoccus sciuri*, *Massilia agri*, *Massilia haematophila*, *Microbacterium oxydans*, *Micrococcus yunnanensis*, *Moraxella osloensis*, *Nocardia globerula*, *Paenibacillus terrigena*, *Planomicrobium okeanokoites*, *Priestia megaterium*, *Pseudarthrobacter oxydans*, *Pseudomonas parafulva*, *Pseudomonas straminea*, *Rhodococcus biphenylivorans* 및 *Roseomonas mucosa* 으로 이루어진 군 중에서 선택되는 세균에 해당되는지를 판단하는 단계를 포함하는, 생물유해인자에 의한 실내 공기오염 여부를 분석하는 방법을 제공한다.

[0020] 또한 본 발명은, (1) 실내 공기를 흡입시켜 채취한 후 배지에 충돌시켜 공기 중의 총 부유미생물을 포집하는 단계; (2) 포집된 부유미생물을 배지에 접종하고 배양한 후 동정하는 단계; 및 (3) 동정한 부유미생물이 *Alternaria alternata*, *Arthrinium camelliae-sinensis*, *Fusarium fujikuroi*, *Fusarium incarnatum*, *Microdochium albescens*, *Neurospora tetrasperma*, *Penicillium glabrum*, *Penicillium sclerotiorum*, *Phanerochaete sordida* 및 *Trichoderma harzianum* 으로 이루어진 군 중에서 선택되는 곰팡이에 해당되는지를 판단하는 단계를 포함하는, 생물유해인자에 의한 실내 공기오염 여부를 분석하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0021] 본 발명에 따른 실내 공기 중의 생물유해인자를 스크리닝하는 방법은 실내 공기에 존재하는 생물유해인자를 동정할 수 있으며, 생물유해인자에 의한 세포 및 생물체 반응 및 독성 평가를 수행할 수 있어, 궁극적으로 실내공

기 중의 생물유해인자를 제어할 수 있는 시스템 구축에 유용하게 활용할 수 있으며, 실내 생물유해인자의 종합적인 인체 영향 평가에도 유용하게 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은 인체 폐 세포주인 MRC5 세포주를 대상으로 생물유해인자(세균 및 곰팡이)를 저농도(1A) 및 고농도(1B)로 24시간 처리 후, 세포 생존률 분석으로 세포 독성 여부를 분석한 결과이다.

도 2는 인체 폐 세포주인 MRC5 세포주를 대상으로 생물유해인자(세균 및 곰팡이)를 저농도(2A) 및 고농도(2B)로 48시간 처리 후, 세포 생존률 분석으로 세포 독성 여부를 분석한 결과이다.

도 3은 인체 폐 세포주인 MRC5 세포주를 대상으로 생물유해인자인 곰팡이를 농도별로 24시간 및 48시간 동안 각각 처리한 후, 세포 생존률 분석으로 세포 독성 여부를 분석한 결과이다.

도 4는 인체 장상피 세포주인 HeLa 세포주를 대상으로 생물유해인자(세균 및 곰팡이)를 저농도(4A) 및 고농도(4B)로 24시간 처리 후, 세포 생존률 분석으로 세포 독성 여부를 분석한 결과이다.

도 5는 인체 장상피 세포주인 HeLa 세포주를 대상으로 생물유해인자(세균 및 곰팡이)를 저농도(5A) 및 고농도(5B)로 48시간 처리 후, 세포 생존률 분석으로 세포 독성 여부를 분석한 결과이다.

도 6은 인체 장상피 세포주인 HeLa 세포주를 대상으로 생물유해인자인 곰팡이를 농도별로 24시간 및 48시간 동안 각각 처리한 후, 세포 생존률 분석으로 세포 독성 여부를 분석한 결과이다.

도 7은 인체 구강 상피 세포주인 YD38 세포주를 대상으로 생물유해인자(세균 및 곰팡이)를 저농도(7A) 및 고농도(7B)로 24시간 처리 후, 세포 생존률 분석으로 세포 독성 여부를 분석한 결과이다.

도 8은 인체 구강 상피 세포주인 YD38 세포주를 대상으로 생물유해인자(세균 및 곰팡이)를 저농도(8A) 및 고농도(8B)로 48시간 처리 후, 세포 생존률 분석으로 세포 독성 여부를 분석한 결과이다.

도 9는 인체 구강 상피 세포주인 YD38 세포주를 대상으로 생물유해인자인 곰팡이를 농도별로 24시간 동안 처리한 후, 세포 생존률 분석으로 세포 독성 여부를 분석한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 본 발명은 실내 공기 중의 생물유해인자를 스크리닝하는 방법 및 상기 스크리닝의 생물유해인자를 이용하여 실내 공기오염 여부를 분석하는 방법을 제공함에 특징이 있다.

[0024] 실내 공기 중에 존재하는 생물학적 요인이 인체의 건강에 영향을 주며 질환의 발생 또는 악화의 원인으로 작용한다는 연구들이 보고되면서, 실내공기의 생물학적 유해인자를 분석하기 위한 노력들이 진행 중에 있으나, 이에 대한 연구가 미비한 실정이다.

[0025] 이에 본 발명자들은 실내 공기 중의 생물학적 유해인자들을 분석하기 위해, 일반가정, 환자가정, 다중이용시설 및 코호트 시설 등 다양한 환경의 실내공기를 포집하여 이들 환경에 존재하는 미생물을 분석하였고, 각 미생물이 세포에 미치는 영향을 분석하였다.

[0026] 특히 본 발명에서는 생물학적 유해인자의 경우, 대부분 호흡기를 통해 인체로 들어오며, 그 경로에는 구강, 호흡기/심혈관계, 장관계 등이 주요하게 관여하고 있어, 이러한 각 인체 부위에서 분리하여 배양된 세포들을 대상으로 실내 공기 중의 생물학적 유해인자들을 분석하였다.

[0027] 먼저 본 발명의 일실시예에서는, in vitro에서 생물유해인자의 세포 독성 평가를 위한 시험 조건을 확립하기 위해, 대상 세포주로서 구강상피세포로는 YD38 세포주를, 폐세포주로는 MRC5 세포를, 장상피세포로는 HeLa 세포주를 선택하여 사용하였다.

[0028] 선택한 각 세포주를 대상으로 종류별 생물유해인자를 농도별로 상기 세포주에 처리하고 배양한 다음, 각 세포주의 세포 생존률을 분석하였다.

[0029] 이때 생물유해인자로는 세균(박테리아) 및 곰팡이를 사용하였으며, 세포 독성 평가를 위해 MTT 어세이 또는 LDH 어세이를 수행하였다.

[0030] 분석 결과, 곰팡이 처리의 경우, 저농도($1x10^{1}$~$1x10^{5}$ CFU/ml) 처리만으로도 상기 3종류의 세포주에서 세포 독성

이 유도되는 것으로 나타난 반면, 세균 처리의 경우에는 고농도($1x10^{6}$~$1x10^{10}$ CFU/ml)처리 군에서 세포 독성이 유도되는 것으로 나타났다. 또한 배양 시간은 24시간 및 48시간 간에 큰 차이를 나타내지 않았다. 따라서 배양 시간은 24시간이 적합함을 알 수 있었고, 세포 독성 평가에 있어서 배양 시간 보다는 처리 농도가 더 주요한 요인으로 작용함을 알 수 있었다.

[0031] 나아가 본 발명자들은 포집된 실내공기 중의 생물 유해인자를 확인하기 위해, 실내 공기를 흡입시켜 채취한 후 배지에 충돌시켜 공기 중의 총 부유미생물을 포집한 다음, 포집된 부유미생물을 배지에 접종하고 배양한 후 동정하였다.

[0032] 이후 각 동정된 부유미생물을 대상으로 인체로부터 분리된 구강상피세포, 폐세포 및 장상피세포에 각각 처리하여 배양한 다음, 상기 세포의 세포독성 여부를 세포생존률 분석을 통해 수행하였다.

[0033] 그 결과, 총 70종의 세균들 중에서 *Acinetobacter johnsonii*, *Acinetobacter pittii*, *Agrococcus baldri*, *Arthrobacter bussei*, *Bacillus aerius*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus proteolyticus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus wiedmannii*, *Brachybacterium paraconglomeratum*, *Brevundimonas bullata*, *Brevundimonas diminuta*, *Brevundimonas vesicularis*, *Chryseobacterium gwangjuense*, *Chryseobacterium taihuense*, *Corynebacterium glutamicum*, *Exiguobacterium acetylicum*, *Kocuria carniphila*, *Kocuria marina*, *Kocuria rosea*, *Kocuria salsicia*, *Leucobacter chromiiresistens*, *Lysinibacillus parviboronicapiens*, *Mammaliicoccus sciuri*, *Massilia agri*, *Massilia haematophila*, *Microbacterium oxydans*, *Micrococcus yunnanensis*, *Moraxella osloensis*, *Nocardia globerula*, *Paenibacillus terrigena*, *Planomicrobium okeanokoites*, *Priestia megaterium*, *Pseudarthrobacter oxydans*, *Pseudomonas parafulva*, *Pseudomonas straminea*, *Rhodococcus biphenylivorans* 및 *Roseomonas mucosa* 세균은 구강상피세포, 폐세포 및 장상피세포 모두에 대해 세포독성을 나타내어 70% 미만의 세포 생존률을 보이는 생물유해인자에 해당된다는 것을 알 수 있었다.

[0034] 반면, *Microbacterium testaceum*, *Micrococcus aloeverae*, *Neomicrococcus lactis* 및 *Pseudarthrobacter sulfonivorans* 세균들은 구강상피세포, 폐세포 및 장상피세포 모두에 대해 세포독성을 나타내지 않는 것으로 나타나, 이들 4종류의 세균들은 실내 공기 중의 생물유해인자를 스크리닝하는데 있어서 대조군 균종으로 사용할 수 있음을 알 수 있었다.

[0035] 또한, 곰팡이 분석 결과에서는 *Alternaria alternata*, *Arthrinium camelliae-sinensis*, *Fusarium fujikuroi*, *Fusarium incarnatum*, *Microdochium albescens*, *Neurospora tetrasperma*, *Penicillium glabrum*, *Penicillium sclerotiorum*, *Phanerochaete sordida* 및 *Trichoderma harzianum* 곰팡이가 구강상피세포, 폐세포 및 장상피세포 모두에 대해 세포독성을 나타내어 70% 미만의 세포 생존률을 보이는 생물유해인자에 해당된다는 것을 알 수 있었다.

[0036] 반면, *Aspergillus niger*, *Bjerkandera adusta*, *Cladosporium cladosporioides*, *Hypocrea lutea*, *Moesziomyces aphidis*, *Penicillium rolfsii*, *Rhodotorula dairenensis* 및 *Rhodotorula glutinis* 곰팡이들은 구강상피세포, 폐세포 및 장상피세포 모두에 대해 세포독성을 나타내지 않는 것으로 나타나, 이들 8종류의 곰팡이들은 실내 공기 중의 생물유해인자를 스크리닝하는데 있어서 대조군 균종으로 사용할 수 있음을 알 수 있었다.

[0037] 그러므로 본 발명은 인체로부터 분리된 구강상피세포, 폐세포 또는 장상피세포에 실내공기에 존재하는 세균 또는 곰팡이를 처리하여 배양한 후, 상기 세포의 세포독성을 분석하는 단계를 포함하는, 실내 공기 중의 생물유해인자를 스크리닝하는 방법을 제공할 수 있다.

[0038] 본 발명에서 상기 세균 또는 곰팡이는 $1x10^{1}$~$1x10^{10}$의 CFU/ml의 농도로 상기 세포에 처리할 수 있으며, 바람직하게는 $1x10^{5}$~$1x10^{9}$의 CFU/ml의 농도로 상기 세포에 처리할 수 있다. 더욱 바람직하게 세균의 경우, $1x10^{9}$의 CFU/ml의 농도로 처리할 수 있고, 곰팡이의 경우, $1x10^{5}$의 CFU/ml의 농도로 처리할 수 있다.

[0039] 상기 배양은 당업계에서 사용되는 세균 또는 곰팡이 배지를 이용하여 24~48시간 동안 배양할 수 있으며, 바람직하게는 24시간 동안 배양할 수 있다.

[0040] 상기 본 발명의 방법에서, 세균 또는 곰팡이를 처리하지 않은 대조군을 기준으로, 세균 또는 곰팡이를 처리한 세포의 생존률이 70% 미만인 경우, 상기 세균 또는 곰팡이는 세포독성이 있는 것으로 판단할 수 있다.

[0041] 본 발명의 방법을 통해 실내 공기 부유미생물 중에서, *Acinetobacter johnsonii*, *Acinetobacter pittii*, *Agrococcus baldri*, *Arthrobacter bussei*, *Bacillus aerius*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus proteolyticus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus wiedmannii*, *Brachybacterium paraconglomeratum*, *Brevundimonas bullata*, *Brevundimonas diminuta*, *Brevundimonas vesicularis*, *Chryseobacterium gwangjuense*, *Chryseobacterium taihuense*, *Corynebacterium glutamicum*, *Exiguobacterium acetylicum*, *Kocuria carniphila*, *Kocuria marina*, *Kocuria rosea*, *Kocuria salsicia*, *Leucobacter chromiiresistens*, *Lysinibacillus parviboronicapiens*, *Mammaliicoccus sciuri*, *Massilia agri*, *Massilia haematophila*, *Microbacterium oxydans*, *Micrococcus yunnanensis*, *Moraxella osloensis*, *Nocardia globerula*, *Paenibacillus terrigena*, *Planomicrobium okeanokoites*, *Priestia megaterium*, *Pseudarthrobacter oxydans*, *Pseudomonas parafulva*, *Pseudomonas straminea*, *Rhodococcus biphenylivorans* 및 *Roseomonas mucosa* 으로 이루어진 군 중에서 선택되는 세균은 구강상피세포, 폐세포 및 장상피세포 모두에 대해 세포독성을 나타내어 70% 미만의 세포 생존률을 보이는 생물유해인자인 것을 규명하였다.

[0042] 반면, 실내 공기 부유미생물 중에서, *Microbacterium testaceum*, *Micrococcus aloeverae*, *Neomicrococcus lactis* 및 *Pseudarthrobacter sulfonivorans* 으로 이루어진 군 중에서 선택되는 세균은 구강상피세포, 폐세포 및 장상피세포 모두에 대해 세포독성을 나타내지 않아, 이들은 생물유해인자에 해당되지 않는 세균으로 판단하였고, 나아가 상기 4종의 세균들은 실내 공기 중의 생물유해인자를 스크리닝에 있어서, 대조군 미생물 균종으로 활용할 수 있음을 알 수 있었다.

[0043] 뿐만 아니라 본 발명의 방법을 통해 실내 공기 부유미생물 중에서, *Alternaria alternata*, *Arthrinium camelliae-sinensis*, *Fusarium fujikuroi*, *Fusarium incarnatum*, *Microdochium albescens*, *Neurospora tetrasperma*, *Penicillium glabrum*, *Penicillium sclerotiorum*, *Phanerochaete sordida* 및 *Trichoderma harzianum* 으로 이루어진 군 중에서 선택되는 곰팡이는 구강상피세포, 폐세포 및 장상피세포 모두에 대해 세포독성을 나타내어 70% 미만의 세포 생존률을 보이는 생물유해인자인 것을 규명하였고, 반면 *Aspergillus niger*, *Bjerkandera adusta*, *Cladosporium cladosporioides*, *Hypocrea lutea*, *Moesziomyces aphidis*, *Penicillium rolfsii*, *Rhodotorula dairenensis* 및 *Rhodotorula glutinis* 으로 이루어진 군 중에서 선택되는 곰팡이는 구강상피세포, 폐세포 및 장상피세포 모두에 대해 세포독성을 나타내지 않아, 이들은 생물유해인자에 해당되지 않는 곰팡이인 것으로 확인되었고 따라서 상기 곰팡이들은 실내 공기 중의 생물유해인자를 스크리닝하는 방법에 있어서, 대조군 균종으로 활용할 수 있음을 알 수 있었다.

[0044] 나아가 본 발명은, 생물유해인자에 의한 실내 공기오염 여부를 분석하는 방법을 제공할 수 있는데, 상기 방법은, (1) 실내 공기를 흡입시켜 채취한 후 배지에 충돌시켜 공기 중의 총 부유미생물을 포집하는 단계; (2) 포집된 부유미생물을 배지에 접종하고 배양한 후 동정하는 단계; 및 (3) 동정한 부유미생물이 *Acinetobacter johnsonii*, *Acinetobacter pittii*, *Agrococcus baldri*, *Arthrobacter bussei*, *Bacillus aerius*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus proteolyticus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus wiedmannii*, *Brachybacterium paraconglomeratum*, *Brevundimonas bullata*, *Brevundimonas diminuta*, *Brevundimonas vesicularis*, *Chryseobacterium gwangjuense*, *Chryseobacterium taihuense*, *Corynebacterium glutamicum*, *Exiguobacterium acetylicum*, *Kocuria carniphila*, *Kocuria marina*, *Kocuria rosea*, *Kocuria salsicia*, *Leucobacter chromiiresistens*, *Lysinibacillus parviboronicapiens*, *Mammaliicoccus sciuri*, *Massilia agri*, *Massilia haematophila*, *Microbacterium oxydans*, *Micrococcus yunnanensis*, *Moraxella osloensis*, *Nocardia globerula*, *Paenibacillus terrigena*, *Planomicrobium okeanokoites*, *Priestia megaterium*, *Pseudarthrobacter oxydans*, *Pseudomonas parafulva*, *Pseudomonas straminea*, *Rhodococcus biphenylivorans* 및 *Roseomonas mucosa* 으로 이루어진 군 중에서 선택되는 세균에 해당되는지를 판단하는 단계를 포함할 수 있다.

[0045] 또 다른 생물유해인자에 의한 실내 공기오염 여부를 분석하는 방법은, (1) 실내 공기를 흡입시켜 채취한 후 배지에 충돌시켜 공기 중의 총 부유미생물을 포집하는 단계; (2) 포집된 부유미생물을 배지에 접종하고 배양한 후 동정하는 단계; 및 (3) 동정한 부유미생물이 *Alternaria alternata*, *Arthrinium camelliae-sinensis*, *Fusarium fujikuroi*, *Fusarium incarnatum*, *Microdochium albescens*, *Neurospora tetrasperma*, *Penicillium glabrum*, *Penicillium sclerotiorum*, *Phanerochaete sordida* 및 *Trichoderma harzianum* 으로 이루어진 군 중에서 선택되는 곰팡이에 해당되는지를 판단하는 단계를 통해 수행할 수 있다.

[0046] 상기 방법을 통해, 동정된 부유미생물이 생물유해인자에 해당되는 세균 또는 곰팡이에 해당되는 경우, 실내 공

기는 인체 세포에 독성을 유발할 수 있는 생물유해인자로 오염되어 있다고 판단할 수 있다.

[0047] 본 발명자들은 상기와 같은 실험결과들을 통해, 실내공기에 존재하는 생물 유해인자는 생물유해인자의 단순한 양적증가가 세포 독성을 유발하는 것이 아니라, 특정 생물유해인자, 즉 특정 종류의 생물유해인자(특정 종류의 세균 또는 곰팡이)가 세포 독성을 유발하는 것으로, 균종별 특이성이 존재한다는 것을 알 수 있었다.

[0048] 또한, 본 발명자들은 본 발명의 스크리닝 방법으로 규명된 실내 공기 중의 생물유해인자들에 대한 공통적인 특성이(예컨대, 특정 단백질 및 대사체 등) 세포 대사에 영향을 미칠 수 있음을 알 수 있었다.

[0050] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0052] **<준비예 및 실험방법>**

[0053] 생물유해인자 세포독성실험의 표준화를 위한 미생물 준비

[0054] 박테리아 종으로 *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis* 및 *Micrococcus luteus*를 사용하였고, 곰팡이 종으로 *Cladosporium cladosporioides*, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillum spp* 을 사용하였다. 이들 박테리아 종 및 곰팡이 종은 모두 한국 세포주 은행에서 제공받아 사용하였다.

[0056] 미생물 배양 및 전처리 과정

[0057] ① 박테리아

[0058] *Micrococcus* 속을 제외한 다른 박테리아들은 각각 50 ml Luria Bertani(LB) 브로쓰에 접종하고 37℃ 진탕 배양기에서 16시간 동안 배양하였으며, *Micrococcus* 속 세균은 50 ml Nutrient 브로쓰에 접종하여 25℃ 진탕 배양기에서 2일 동안 배양하였다.

[0059] 전처리 과정은 다음과 같이 수행하였다. 상기와 같이 배양된 세균은 원심분리하여 회수하고 차가운 PBS(phosphate buffered saline)로 2회 세척 후 3 ml의 차가운 PBS로 세균 부유액을 제조하고, 세균 부유액을 10배 희석하여 흡광도(600 nm, spectrophotometer)를 측정하였다. 이때 실험에 필요한 세균의 농도는 2 x 10^9 CFU/ml (O.D.=1)을 기준으로 하였다.

[0061] ② 곰팡이

[0062] 곰팡이들은 PDA(Potato Dextrose Agar) 플레이트에 각각 접종하고 25℃ 배양기에서 5일 동안 배양하였다.

[0063] 또한 전처리 과정은 다음과 같이 수행하였다. 10 ml의 PBS를 PDA 플레이트에서 배양된 곰팡이에 부어 일회용 스프레더를 사용하여 포자를 모았다. 곰팡이 포자 부유액은 Miracloth에 걸러 포자만을 순수 분리하였다. 이후 곰팡이 농도를 결정하기 위하여 곰팡이 부유액을 10배 희석한 후 헤마토사이토메터에서 측정하여 농도를 결정하였다.

[0065] 상기 박테리아 및 곰팡이의 비활성화는 물중탕으로 수행하였는데, PBS에 함유된 세균 및 곰팡이 부유액을 끓는 물에 10분간 중탕하여 비활성화하였다.

[0066] 또한 박테리아(세균) 및 곰팡이의 부유액은 사용하기 전까지 -70℃ 냉동고에서 보관한 후, 실험에 사용하였다.

[0068] 세포독성 평가방법의 조건 확립방법

[0069] 세포독성 평가를 위한 세포 종류로는 MRC5(폐 세포주), HeLa(장상피 세포주), YD38(구강 상피 세포주) 세포를 사용하였다. 세포독성 평가는 MTT 어세이 및 LDH 어세이로 수행하였다.

[0071] ① MTT 어세이

[0072] MTT 어세이는 세포 내 기관인 미토콘드리아가 가지고 있는 탈수소효소와 반응하는 시약인 MTT를 이용하여 색 변화 정도를 측정함으로써 세포 생존률을 확인하는 방법이다.

[0073] 본 실험에서는 96 웰 플레이트에 MRC5 세포를 $2x10^4$ /웰, Hela 세포를 $1x10^4$ /웰, YD38 세포를 $2x10^4$ /웰의 세포수로 분주한 후, 37℃, 5% CO2 조건에서 24시간 배양하였다. 이후 현미경으로 세포가 70% 정도 자랐을 때, 남아 있는 배지를 조심스럽게 제거하였다. FBS만 첨가된 배지에 미생물 시료를 연속 희석 방법으로 미리 희석해 둔 후, 농도별로 각 세포에 처리하였다. 배양 시간별(24시간, 48시간) 배양 후, MTT 표지 시약(최종농도 0.5 mg/ml)을 10 ul 첨가한 후, 37℃ 배양기에서 4시간 배양하였다. 이후 37℃ 항온수조에서 녹여 놓은 가용화 버퍼 100ul를 첨가하고, 18 시간이 경과한 후 마이크로플레이트용 ELISA 판독기로 580nm 에서 광학밀도를 측정하였다. 또한 세포 생존률은 하기 계산식으로 계산하였다.

[0074] Cell viability (%) = (시료 처리군 OD580 / 시료 미처리군 OD580) ×100

[0076] ② LDH 어세이

[0077] LDH 어세이는 세포가 실제 손상되어 세포밖으로 방출되는 lactate dehydrogenase의 양을 측정하는 것으로, MTT 어세이로 측정할 수 있는 세포 독성 보다 강한 세포 독성을 평가하는 방법이다.

[0078] 구체적으로 LDH 어세이 분석을 위해, WST 기질을 LDH 어세이 버퍼에 첨가하고 LDH 반응 혼합물을 제조하였다. 이후 96웰 플레이트에 MRC5 세포를 $2x10^4$ /웰, Hela 세포를 $1x10^4$ /웰, YD38 세포를 $2x10^4$ /웰의 세포수로 분주한 후, 37℃, 5% CO2 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후 현미경으로 세포가 70% 정도 자랐을 때, 남아 있는 배지를 조심스럽게 제거하였다. 이후 FBS만 첨가된 배지에 미생물 시료를 연속 희석 방법으로 미리 희석해 둔 후 농도별로 각 세포에 처리하였다. 배양 시간별(24시간, 48시간) 배양 후, 세포용해 용액을 웰 당 10 ul씩 첨가하고 5분 동안 배양하여 세포를 용해시켰다. LDH 반응 혼합물을 각 웰이 100 ul씩 첨가하여 섞어주고 플레이트를 빛이 차단된 상온에서 30분 동안 반응시킨 후, 정지 용액을 각 웰에 10 ul씩 첨가하여 부드럽게 섞어준 후 플레이트 리더기를 이용하여 490 nm에서 측정하였으며, 세포 독성정도를 하기 수식으로 계산하였다.

[0079] Cytotoxicity(%)=

[0080] (시료처리군-Lower control/Upper control-Lower control)x100

[0082] **<실시예 1>**

[0083] **세포주에 미치는 생물 유해인자의 독성평가 조건 확립**

[0084] MRC5(폐 세포주), HeLa(장상피 세포주), YD38(구강 상피 세포주) 세포를 대상으로 생물 유해인자의 독성평가 수행이 가능한 조건을 확립하기 위해, 생물 유해인자들의 처리 농도 및 처리 시간을 달리하여 각 세포주의 세포 생존률을 분석하였다. 이때 생물 유해인자들은 상기 준비예 및 실험방법에 기재된 박테리아 및 곰팡이들을 이용하여 분석하였다.

[0085]

[0086] <1-1> MRC5 세포주를 대상으로 생물 유해인자의 독성평가 조건분석

[0087] 인체 폐세포주인 MRC5 세포주를 대상으로 미생물 시료를 농도별(저농도 군: 10^1 CFU/ml~10^5 CFU/ml, 고농도 군: 10^6 CFU/ml~10^{10} CFU/ml)로 처리하고 24시간 및 48 시간 동안 각각 처리한 후, 세포 생존률을 분석하였다.

[0089] 그 결과, 생물 유해인자들을 처리하고 24시간 배양한 경우, 저농도 처리 군에서는 곰팡이 시료들이 MRC5 세포 생존률을 유의하게 감소시키는 것으로 나타났고(도 1A), 박테리아(세균) 처리 군에서는 큰 변화가 거의 없었으나, 고농도 처리군의 결과에서는 *Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Bacillus subtilis* 등의 세균 처리 군에서 유의한 세포 생존률 감소 결과를 나타내었다(도 1B).

[0091] 또한, 48시간 배양한 결과에서는 저농도의 곰팡이 처리 군에서 세포 생존률 감소가 24시간 배양 결과와 유사하게 나타났으며, 세균 처리군의 경우, 저농도에서는 세포 생존률이 감소되지 않았으며(도 2A), 고농도에서만 세포 생존률이 감소되는 것으로 나타났다(도 2B).

[0093] 또한, 전반적으로 곰팡이 처리군의 경우, 저농도에서 세균 처리군에 비해 MRC5 세포주의 생존률 감소 현상이 두드러지게 나타났으며, 곰팡이 처리 농도를 높여도 24시간 및 48시간에서의 생존률 차이는 큰 차이가 없는 것으로 나타났다(도 3).

[0095] <1-2> HeLa 세포주를 대상으로 생물 유해인자의 독성평가 조건분석

[0096] 상기 <1-1>의 방법과 동일하게 수행하되 세포주를 MRC5 세포주가 아닌 인체 장 상피세포주인 HeLa 세포주를 대상으로 분석하였다.

[0098] 그 결과, 생물 유해인자들을 처리하고 24시간 배양한 경우, 저농도 처리군에서는 곰팡이 처리군이 MRC5 세포주 생존률과 거의 유사하게 HeLa 세포주에서도 생존률이 감소되는 것으로 나타났고(도 4A), 세균 처리 군에서는 큰 변화가 거의 없었으나, 10^9 CFU/ml 이상의 고농도 처리군에서는 *Staphylococcus aureus* 및 *Bacillus subtilis* 처리군에서 유의한 세포 생존률 감소가 확인되었다(도 4B).

[0100] 또한, 48시간 배양한 결과에서는 MRC5 세포주의 생존률 결과와 유사한 결과를 보였는데, 저농도의 곰팡이 처리군에서는 세포 생존률 감소가 24시간 배양 결과와 유사한 형태로 나타났고(도 5A), 세균 처리군의 경우, 저농도에서는 세포 생존률이 감소되지 않았으며, 고농도에서만 24시간 배양 결과와 유사한 세포 생존률 감소율을 보이는 것으로 나타났고, Bacillus subtilis 처리군에서는 현저한 세포 생존률 감소율을 보였다(도 5B).

[0102] 또한, 곰팡이 처리군의 경우, 저농도 군에서는 세균에 비해 곰팡이 처리 군에서 세포 생존률의 감소 효과가 두드러지게 나타났고, 고농도 처리 군의 경우 24시간 및 48시간의 세포 생존률은 거의 비슷하게 나타났다(도 6).

[0104] <1-3> YD38 세포주를 대상으로 생물 유해인자의 독성평가 조건분석

[0105] 상기 <1-1>의 방법과 동일하게 수행하되 세포주를 MRC5 세포주가 아닌 인체 구강 상피세포주인 YD38 세포주를 대상으로 분석하였다.

[0107] 그 결과, 생물 유해인자들을 처리하고 24시간 배양한 경우, 저농도 처리군에서는 곰팡이 처리군들이 MRC5나 HeLa 세포주의 결과와 유사하게 YD38 세포주의 생존률이 감소되는 것으로 나타났고(도 7A), 세균 처리 군에서는 변화가 거의 없었으나, 10^9 CFU/ml 이상의 고농도로 처리한 군에서는 *Bacillus subtilis* 시료에서 유의한 세포 생존률 감소를 확인할 수 있었다(도 7B).

[0109] 또한, 48시간 배양한 결과에서는 세균 처리 군들의 경우, MRC5와 HeLa 세포주에서의 결과와 유사한 양상의 결과가 도출되었는데, 저농도 처리군에서는 세포 생존률 감소가 24시간 배양 결과와 마찬가지로 나타났고(도 8A), 세균 처리군들의 경우, 저농도에서는 세포 생존률 감소가 미비하였고, 고농도에서만 24시간 배양 결과와 유사한 감소율을 보였으며(도 8B), 고농도의 *Bacillus subtilis* 처리군 역시 현저한 세포 생존률 감소를 확인할 수 있었다(도 9).

[0111] 이상의 결과를 통해 본 발명자들은 3종류의 세포주들을 대상으로 박테리아(세균) 및 곰팡이의 생물유해인자의 세포 독성을 평가하는 주요 요인으로 생물유해인자의 처리 시간 보다는 처리 농도가 주요한 요인으로 작용할 수 있음을 알 수 있었고, 이러한 결과를 토대로 생물유해인자 처리 후, 세포주에서의 세포독성 평가는 최대 24시간을 설정하여 분석하는 것이 바람직하다는 것을 알 수 있었다.

[0113] **<실시예 2>**

[0114] **실내공기에 존재하는 세균 및 곰팡이가 세포주에 미치는 세포 독성 분석**

[0115] 본 발명자들은 MRC5(폐 세포주), HeLa(장상피 세포주), YD38(구강 상피 세포주) 세포주 모두를 대상으로 실내공기에 존재하는 다양한 세균 및 곰팡이들이 상기 세포주에 미치는 독성 여부를 MTT 분석을 통해 수행하였다. 즉, 하기 표 1에 나타낸 바와 같이 총 70종의 실내에 존재하는 세균(박테리아)을 상기 실시예 1의 미생물 배양 및 전처리 과정으로 처리하여 시료를 준비하고, 상기 3종류의 세포주에 10^9 CFU/ml 의 농도로 처리한 후, 각 세포주들의 생존률을 MTT 분석을 통해 측정하였다. 또한 하기 표 2에는 총 30종의 실내에 존재하는 곰팡이를 상기 실시예 1의 미생물 배양 및 전처리 과정으로 처리하여 시료를 준비한 후, 상기 3종류의 세포주에 10^5 CFU/ml 의 농도로 처리한 다음, 각 세포주들의 생존률을 MTT 분석을 통해 측정하였다.

표 1

생물유해인자인 실내 세균(박테리아)이 3종류의 세포주에 미치는 독성 효과분석

	Species (Bacteria)	YD38 생존률(평균)	MRC5 생존률(평균)	HeLa 생존률(평균)
	Control	100	100	100
1	*Acinetobacter johnsonii*	52	61	54
2	*Acinetobacter lwoffii*	68	**70**	50
3	*Acinetobacter pittii*	60	56	51
4	*Aerococcus baldri*	46	57	42
5	*Arthrobacter bucsei*	24	39	24
6	*Bacillus aerius*	52	58	60
7	*Bacillus cereus*	58	59	60
8	*Bacillus infantis*	52	66	**72**
9	*Bacillus licheniformis*	60	64	50
10	*Bacillus mariflavi*	64	**79**	65
11	*Bacillus proteolyticus*	36	44	54
12	*Bacillus thuringiensis*	56	59	47
13	*Bacillus wiedmannii*	52	42	39
14	*Brachybacterium paraconglomeratum*	38	51	27
15	*Brevibacterium frigoritolerans*	50	**73**	63
16	*Brevibacterium sediminis*	66	**82**	**73**
17	*Brevibacterium senegalense*	60	**75**	62
18	*Brevundimonas bullata*	66	58	42
19	*Brevundimonas diminuta*	63	57	52
20	*Brevundimonas vesicularis*	36	49	30
21	*Chryseobacterium cucumeris*	67	**80**	**70**
22	*Chryseobacterium gwangjuense*	62	51	52
23	*Chryseobacterium taihuense*	48	61	50
24	*Corynebacterium doosanense*	**70**	**84**	66
25	*Corynebacterium glutamicum*	67	66	69
26	*Dermacoccus profundi*	69	**73**	60
27	*Dietzia cercidiphylli*	62	**81**	59
28	*Exiguobacterium acetylicum*	67	60	50
29	*Kocuria carniphila*	57	51	36
30	*Kocuria kwangaliensis*	54	**73**	56
31	*Kocuria marina*	69	60	46
32	*Kocuria palustris*	67	**83**	**77**
33	*Kocuria rhizophila*	**70**	67	50
34	*Kocuria rosea*	47	47	33
35	*Kocuria salsicia*	52	55	42
36	*Leucobacter chromiiresistens*	43	50	44
37	*Lysinibacillus pakistanensis*	**72**	66	54
38	*Lysinibacillus parviboronicapiens*	63	60	64
39	*Mammaliicoccus sciuri*	51	54	47
40	*Massilia aeri*	52	58	52
41	*Massilia haematophila*	65	55	51

[0116]

42	*Microbacterium arborescens*	**79**	**81**	67
43	*Microbacterium oxydans*	53	52	38
44	***Microbacterium testaceum***	**74**	**83**	**73**
45	***Micrococcus aloeverae***	**95**	**112**	**83**
46	*Micrococcus yunnanensis*	57	60	35
47	*Moraxella osloensis*	41	50	44
48	***Neomicrococcus lactis***	**91**	**89**	**75**
49	*Nocardia globerula*	49	68	40
50	*Paenarthrobacter nicotinovorans*	64	**70**	67
51	*Paenibacillus boris*	67	**81**	67
52	*Paenibacillus macquariensis*	68	**87**	**72**
53	*Paenibacillus terrigena*	59	59	44
54	*Planomicrobium okeanokoites*	52	64	54
55	*Priestia aryabhattai*	66	**78**	65
56	*Priestia megaterium*	33	63	42
57	*Pseudarthrobacter oxydans*	63	62	50
58	*Pseudarthrobacter siccitolerans*	**80**	**70**	59
59	***Pseudarthrobacter sulfonivorans***	**78**	**96**	**73**
60	*Pseudomonas parafulva*	50	66	55
61	*Pseudomonas plecoglossicida*	58	**71**	61
62	*Pseudomonas psychrotolerans*	57	**72**	62
63	*Pseudomonas putida*	57	**75**	67
64	*Pseudomonas straminea*	52	65	45
65	*Psychrobacillus psychrodurans*	**70**	**73**	58
66	*Rhodococcus biphenylivorans*	36	60	54
67	*Rosenbergiella epipactidis*	66	**76**	65
68	*Roseomonas mucosa*	39	48	43
69	*Staphylococcus edaphicus*	**72**	**84**	68
70	*Streptomyces californicus*	**71**	56	47

[0117]

[0118] 상기 표 1에서 3가지 세포주 모두에 독성을 나타내는 종들은 빨간색으로 표기하였고, 모두 비독성을 나타내는 종들은 굵은 글씨로 표기하였다.

[0119] 분석 결과, 상기 표 1에 나타낸 바와 같이, 식약처의 세포독성 기준인 MTT 분석에서 세포 생존률 70% 이상을 나타내는 비독성 세균은 *Microbacterium testaceum, Micrococcus aloeverae, Neomicrococcus lactis* 및 *Pseudarthrobacter sulfonivorans*의 4종인 것으로 나타났고, 이들을 제외한 대부분의 세균은 적어도 1개의 세포주에 대해 독성을 나타내었으며, 상기 표 1의 빨간색으로 표기된 39종은 3가지 세포주 모두에 대해 세포독성을 나타내는 것으로 확인되었다.

표 2

생물유해인자인 실내 곰팡이가 3종류의 세포주에 미치는 독성 효과분석

	Species (Fungi)	YD38 생존률(평균)	MRC5 생존률(평균)	HeLa 생존률(평균)
	Control	100	100	100
1	*Alternaria alternata*	56	62	60
2	*Arthrinium camelliae-sinensis*	39	52	43
3	***Aspergillus niger***	**96**	**72**	**74**
4	***Bjerkandera adusta***	**104**	**92**	**92**
5	*Chaetomium globosum*	**77**	53	49
6	***Cladosporium cladosporioides***	**81**	**81**	**80**
7	*Coprinellus radians*	**70**	48	39
8	*Fusarium equiseti*	**72**	69	**74**
9	*Fusarium fujikuroi*	64	61	59
10	*Fusarium incarnatum*	57	58	51
11	*Fusarium proliferatum*	**80**	53	66
12	***Hypocrea lutea***	**89**	**75**	**76**
13	*Irpex lacteus*	**78**	54	43
14	*Microdochium albescens*	51	55	50
15	***Moesziomyces aphidis***	**95**	**100**	**91**
16	*Neurospora tetrasperma*	58	45	41
17	*Penicillium brasilianum*	**73**	47	37
18	*Penicillium chrysogenum*	**75**	50	48
19	*Penicillium crustosum*	**87**	50	56
20	*Penicillium glabrum*	56	58	49
21	*Penicillium oxalicum*	**80**	54	47
22	***Penicillium rolfsii***	**88**	**73**	**74**
23	*Penicillium sclerotiorum*	43	60	57
24	*Phanerochaete sordida*	49	55	46
25	*Phlebia tremellosa*	**78**	56	47
26	***Rhodotorula dairenensis***	**88**	**84**	**93**
27	***Rhodotorula glutinis***	**83**	**90**	**100**
28	*Schizophyllum commune*	**86**	54	51
29	*Trametes versicolor*	**102**	58	55
30	*Trichoderma harzianum*	32	54	50

[0120]

[0121] 상기 표 2 역시, 3가지 세포주 모두에 독성을 나타내는 종들은 빨간색으로 표기하였고, 모두 비독성을 나타내는 종들은 굵은 글씨로 표기하였다.

[0122] 생물 유해인자로서 곰팡이에 대한 세포독성 분석 결과, 상기 표 2에 나타낸 바와 같이, 식약처의 세포독성 기준인 MTT 분석에서 세포 생존률 70% 이상을 나타내는 비독성 곰팡이는 *Aspergillus niger*, *Bjerkandera adusta*, *Cladosporium cladosporioides*, *Hypocrea lutea*, *Moesziomyces aphidis*, *Penicillium rolfsii*, *Rhodotorula dairenensis*, *Rhodotorula glutinis*의 8종인 것으로 나타났고, 이들을 제외한 대부분의 곰팡이들은 적어도 1개의 세포주에 대해 독성을 나타내었으며, 상기 표 2의 빨간색으로 표기된 10종은 3가지 세포주 모두에 대해 세포독성을 나타내는 것으로 확인되었다.

[0124] 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 실내공기 생물 유해인자의 단순한 양적증가가 세포 독성을 유발하는 것이 아니라, 생물 유해인자의 균종별 특이성이 존재한다는 것을 알 수 있었고, 세포독성을 유발하는 실내공기 생물 유해인자의 공통적인 특성(예, 특정 발현 단백질)이 세포 대사에 영향을 미칠 수 있음을 알 수 있었으며, 상기 본 발명에서 확인된 3종 세포주에 대해 세포독성을 나타내지 않는 세균(박테리아) 및 곰팡이들은 시험 대조군 균종으로 활용할 수 있으며, 3종 세포주에 대해 민감한 세포독성을 나타내는 세균(박테리아) 및 곰팡이들은 시험 양성대조군 종으로 활용할 수 있는 등, 실내 공기에 존재하는 생물유해인자들을 평가할 수 있는 방법을 제공할 수 있음을 알 수 있었다.

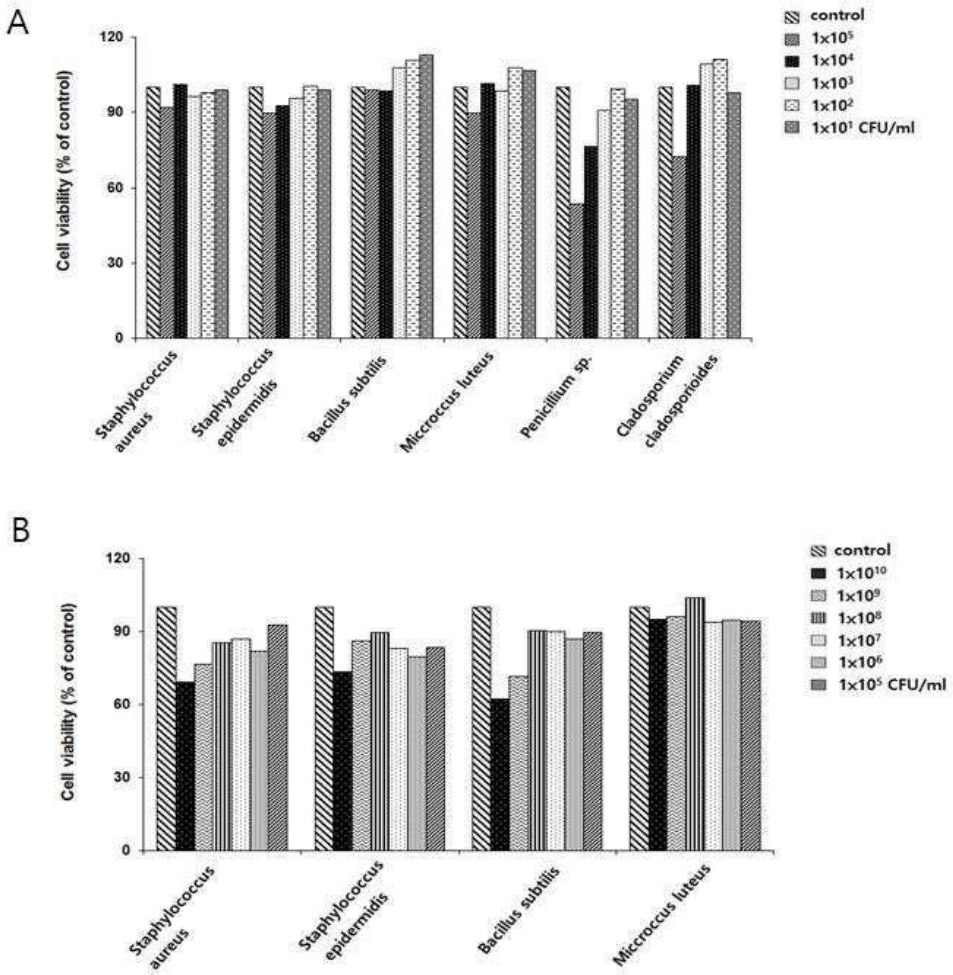
[0125]

[0126] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통

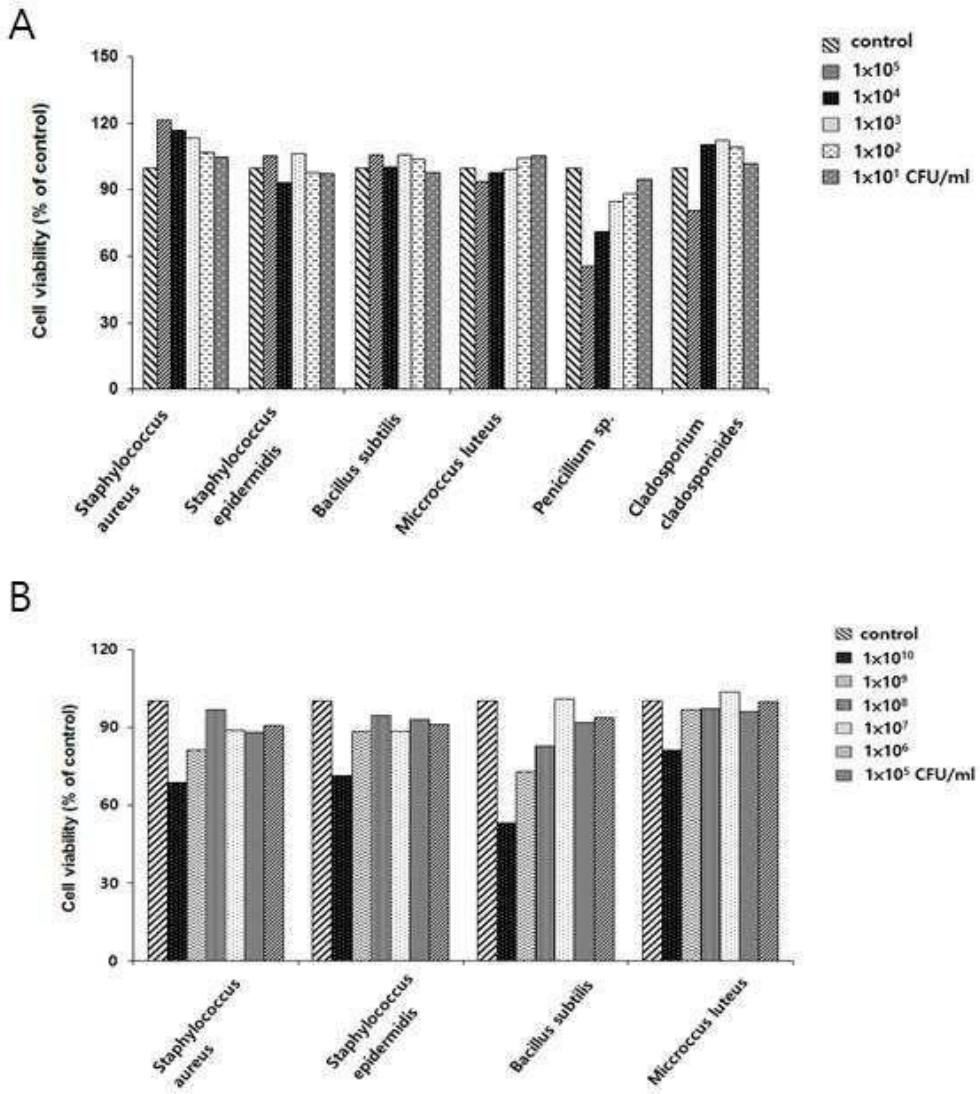
상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

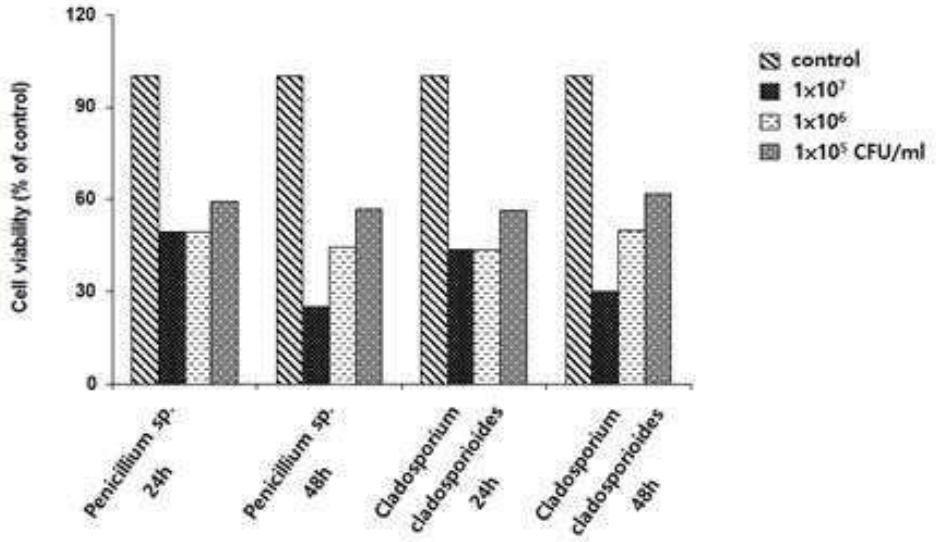
도면1



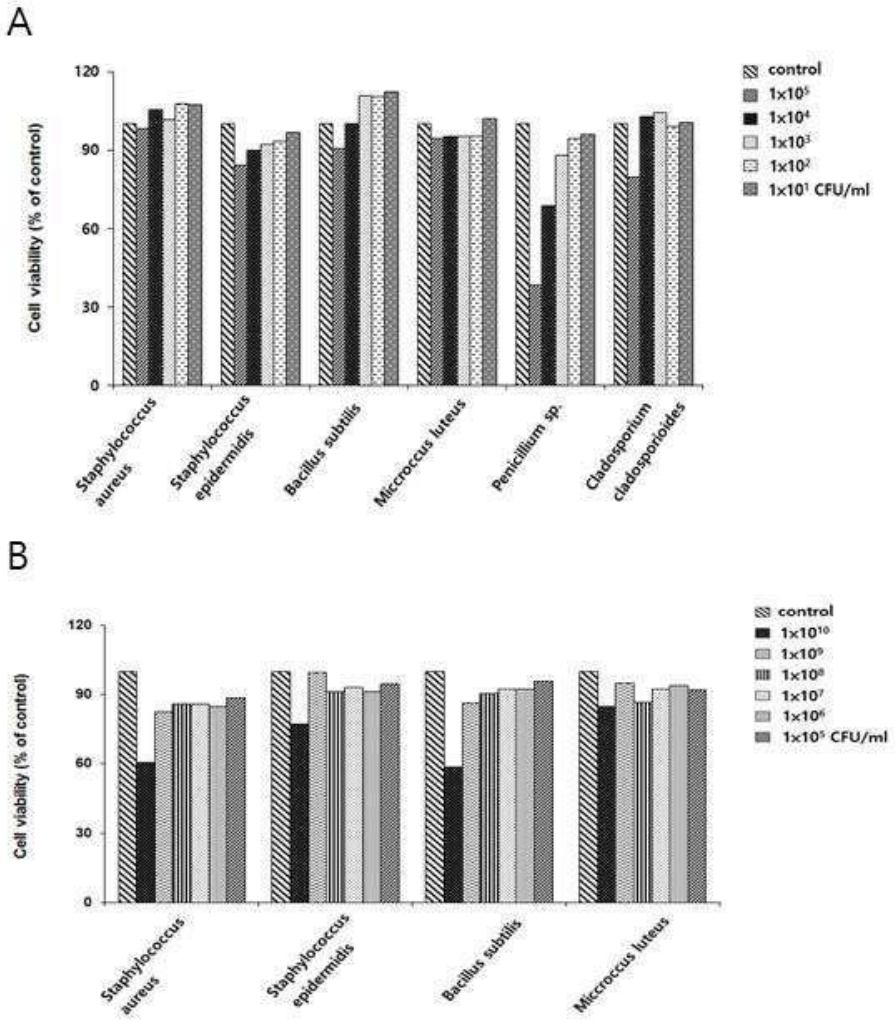
도면2


A
Cell viability (% of control)
150
120
90
60
30
0
control
1x10⁵
1x10⁴
1x10³
1x10²
1x10¹ CFU/ml
Staphylococcus aureus
Staphylococcus epidermidis
Bacillus subtilis
Micrococcus luteus
Penicillium sp.
Cladosporium cladosporioides
B
Cell viability (% of control)
120
90
60
30
0
control
1x10¹⁰
1x10⁹
1x10⁸
1x10⁷
1x10⁶
1x10⁵ CFU/ml
Staphylococcus aureus
Staphylococcus epidermidis
Bacillus subtilis
Micrococcus luteus

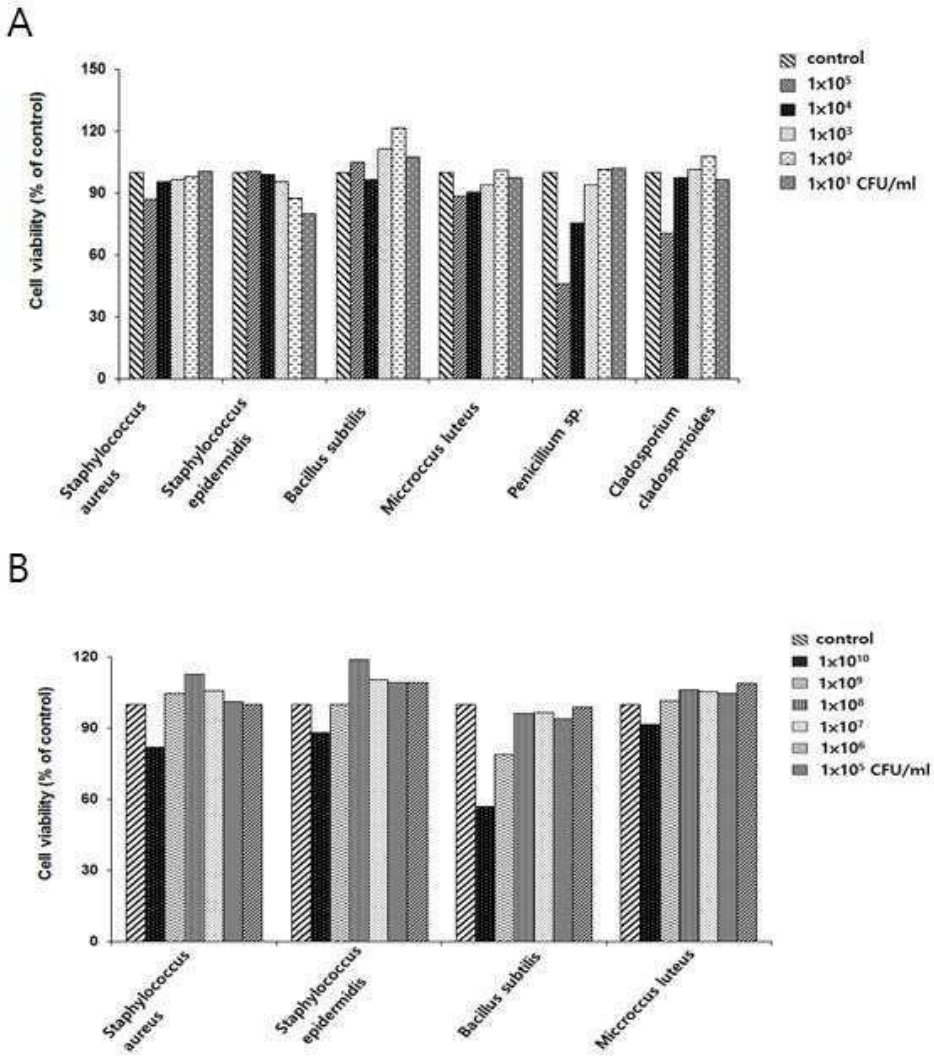
도면3


Cell viability (% of control)
120
90
60
30
0
control
1x10⁷
1x10⁶
1x10⁵ CFU/ml
Penicillium sp. 24h
Penicillium sp. 48h
Cladosporium cladosporioides 24h
Cladosporium cladosporioides 48h

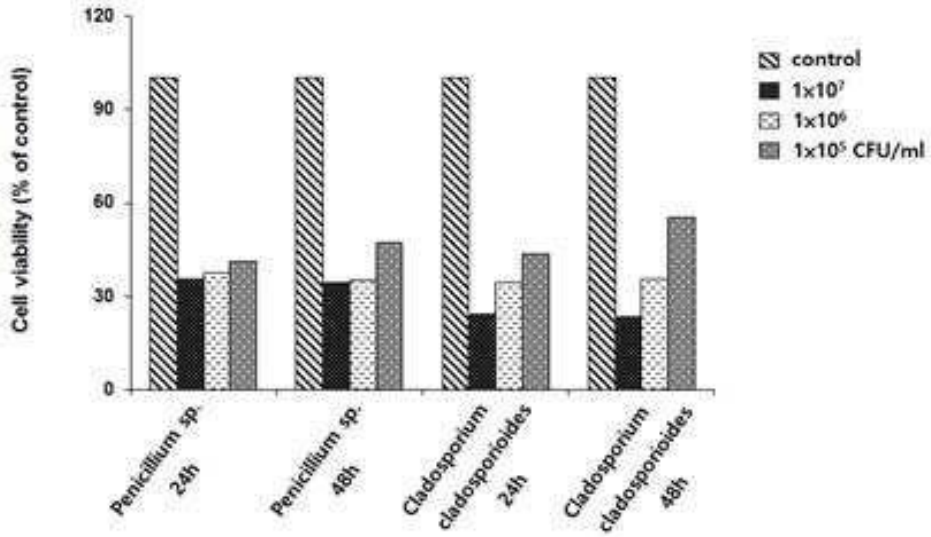
도면4


A
Cell viability (% of control)
120
90
60
30
0
control
1x10⁵
1x10⁴
1x10³
1x10²
1x10¹ CFU/ml
Staphylococcus aureus
Staphylococcus epidermidis
Bacillus subtilis
Micrococcus luteus
Penicillium sp.
Cladosporium cladosporioides
B
Cell viability (% of control)
120
90
60
30
0
control
1x10¹⁰
1x10⁹
1x10⁸
1x10⁷
1x10⁶
1x10⁵ CFU/ml
Staphylococcus aureus
Staphylococcus epidermidis
Bacillus subtilis
Micrococcus luteus

도면5

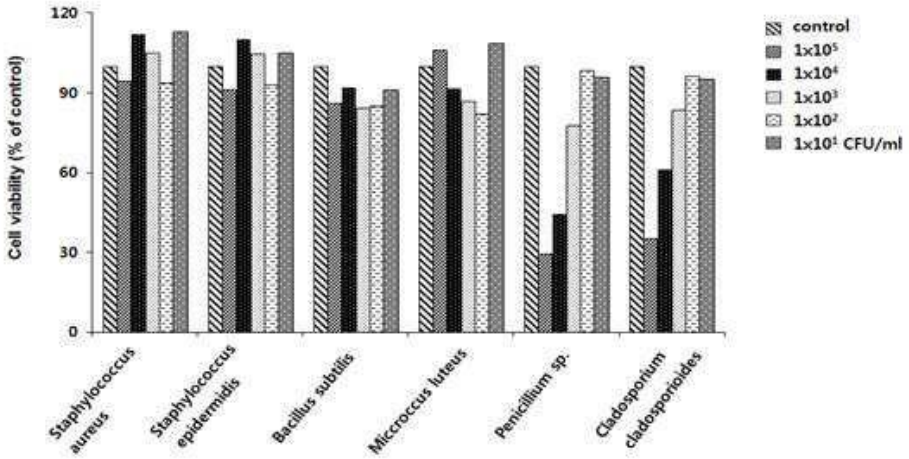

A
Cell viability (% of control)
150
120
90
60
30
0
control
1x10⁵
1x10⁴
1x10³
1x10²
1x10¹ CFU/ml
Staphylococcus aureus
Staphylococcus epidermidis
Bacillus subtilis
Micrococcus luteus
Penicillium sp.
Cladosporium cladosporioides
B
Cell viability (% of control)
120
90
60
30
0
control
1x10¹⁰
1x10⁹
1x10⁸
1x10⁷
1x10⁶
1x10⁵ CFU/ml
Staphylococcus aureus
Staphylococcus epidermidis
Bacillus subtilis
Micrococcus luteus

도면6

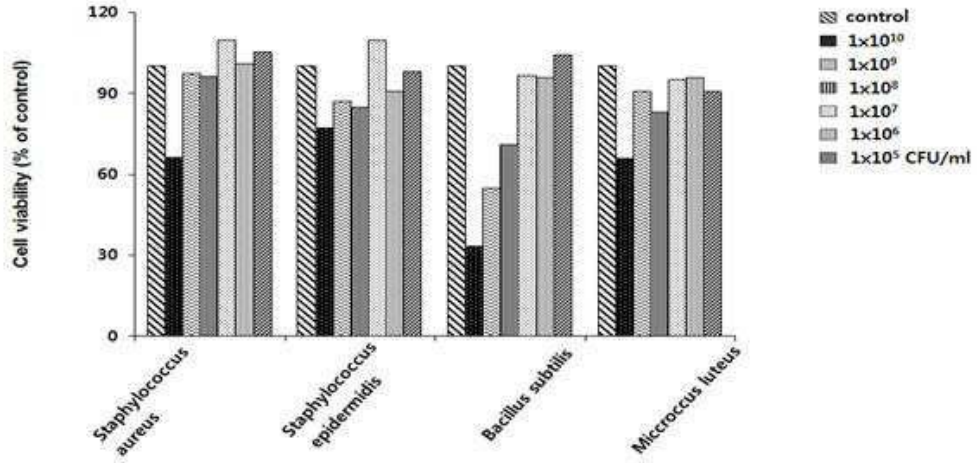

Cell viability (% of control)
120
90
60
30
0
control
1x10⁷
1x10⁶
1x10⁵ CFU/ml
Penicillium sp. 24h
Penicillium sp. 48h
Cladosporium cladosporioides 24h
Cladosporium cladosporioides 48h

도면7

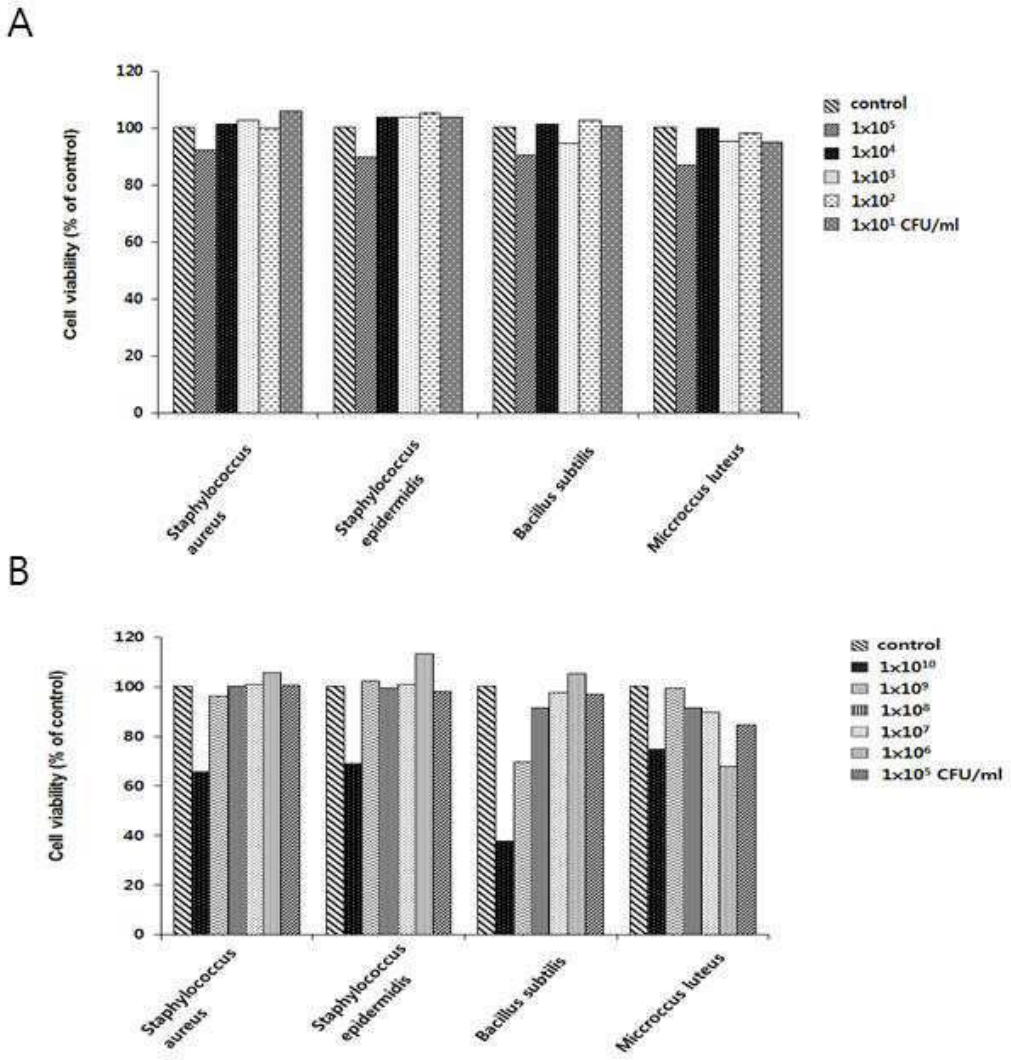
A


Cell viability (% of control)
120
90
60
30
0
control
1x10⁵
1x10⁴
1x10³
1x10²
1x10¹ CFU/ml
Staphylococcus aureus
Staphylococcus epidermidis
Bacillus subtilis
Micrococcus luteus
Penicillium sp.
Cladosporium cladosporioides

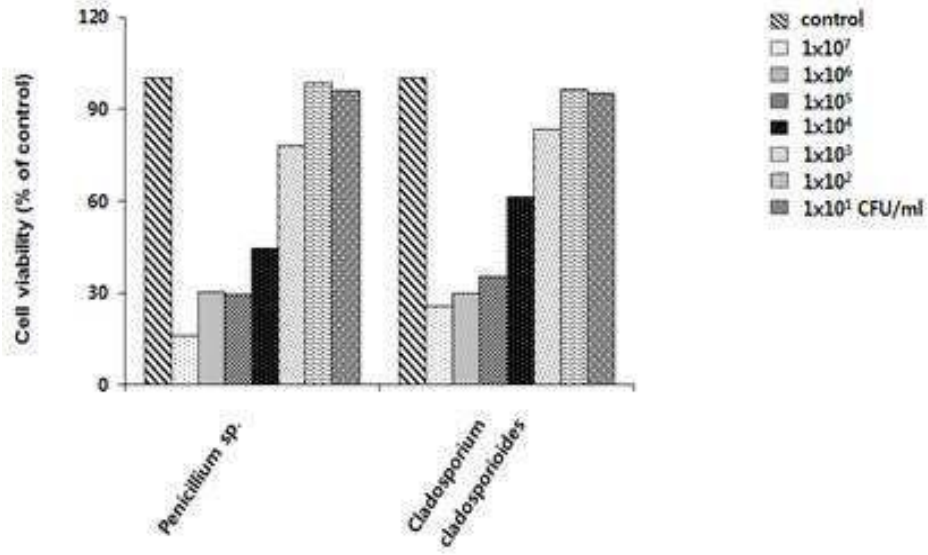
B


Cell viability (% of control)
120
90
60
30
0
control
1x10¹⁰
1x10⁹
1x10⁸
1x10⁷
1x10⁶
1x10⁵ CFU/ml
Staphylococcus aureus
Staphylococcus epidermidis
Bacillus subtilis
Micrococcus luteus

도면8


A
Cell viability (% of control)
120
100
80
60
40
20
0
control
1x10⁵
1x10⁴
1x10³
1x10²
1x10¹ CFU/ml
Staphylococcus aureus
Staphylococcus epidermidis
Bacillus subtilis
Miccroccus luteus
B
Cell viability (% of control)
120
100
80
60
40
20
0
control
1x10¹⁰
1x10⁹
1x10⁸
1x10⁷
1x10⁶
1x10⁵ CFU/ml
Staphylococcus aureus
Staphylococcus epidermidis
Bacillus subtilis
Miccroccus luteus

도면9


Cell viability (% of control)
120
90
60
30
0
control
1x10⁷
1x10⁶
1x10⁵
1x10⁴
1x10³
1x10²
1x10¹ CFU/ml
Penicillium sp.
Cladosporium cladosporioides