(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0066108
(43) 공개일자 2025년05월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
B09B 3/60 (2022.01) *B09B 101/75* (2022.01)
C12N 1/14 (2018.01) *C12N 1/20* (2006.01)
(52) CPC특허분류
B09B 3/60 (2022.01)
C12N 1/14 (2021.05)
(21) 출원번호 10-2023-0151698
(22) 출원일자 2023년11월06일
심사청구일자 2023년11월06일
기술이전 희망 : **기술양도**

(71) 출원인
경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
장유신
경상남도 진주시 진주대로 501, 451동 431호 (가좌동)
성현정
경상남도 진주시 진주대로 501, 451동 431호 (가좌동)
(74) 대리인
위병갑

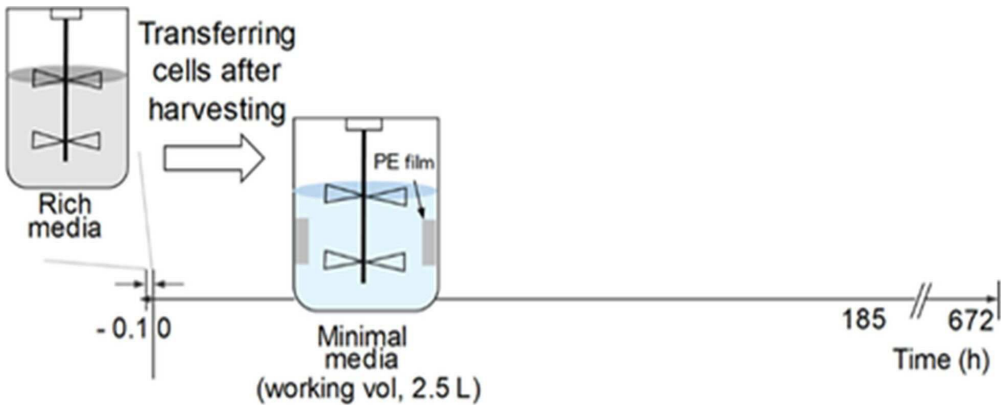
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 **미생물 휴면 세포를 이용한 플라스틱 분해 방법**

(57) 요 약

본 발명은 미생물 휴면 세포 또는 유사 휴면 세포를 이용한 플라스틱 분해 방법에 관한 것으로서, 본 발명의 휴면 세포(resting cell) 또는 유사 휴면 세포(pseudo-resting cell) 상태인 플라스틱 분해능을 지니는 균주 또는 이의 배양액을 플라스틱에 처리하는 단계를 포함하는 플라스틱 분해 방법은 간단한 공정으로 유해물질을 생성하지 않으며 플라스틱을 분해할 수 있는 효과가 있다. 따라서, 본 발명에 따른 아시네토박터 노소코미알리스 GNU001(수탁번호: KCTC 14425BP), 바실러스 서브틸리스(수탁번호: ATCC 6051) 및 바실러스 리케니포미스(수탁번호: ATCC 14580)는 플라스틱 재활용을 위한 전처리 과정 또는 생물 전환 과정 등의 관련 산업 분야에 유용하게 활용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12N 1/20 (2021.05)
B09B 2101/75 (2022.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1395077625
과제번호	RD009383
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	미생물활용농업환경문제개선기술개발(R&D)
연구과제명	시스템대사공학 기반 미생물 효소를 이용한 농업용 폴리에틸렌 분해 기술 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경상국립대학교
연구기간	2020.01.01 ~ 2024.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

휴면 세포(resting cell) 또는 유사 휴면 세포(pseudo-resting cell) 상태인 플라스틱 분해능을 지니는 균주 또는 이의 배양액을 플라스틱에 처리하는 단계를 포함하는, 플라스틱 분해 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 균주는 아시네토박터 속(*Acinetobacter*) 균주, 슈도모나스 속(*Pseudomonas*) 균주, 바실러스 속(*Bacillus*) 균주, 리시니바실러스 속(*Lysinibacillus*) 균주, 아스페르길루스 속(*Aspergillus*) 균주, 엑시구오박테리움 속(*Exiguobacterium*) 균주, 마리노박터 속(*Marinobacter*) 균주, 패니바실러스 속(*Paenibacillus*) 균주, 이디오마리나 속(*Idiomarina*) 균주 및 이디오넬라 속(*Idonella*) 균주에서 선택되는 어느 하나 이상의 균주인 것을 특징으로 하는, 플라스틱 분해 방법.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 아시네토박터 속(*Acinetobacter*) 균주는 아시네토박터 노소코미알리스(*Acinetobacter nosocomialis*)인 것을 특징으로 하는, 플라스틱 분해 방법.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 아시네토박터 노소코미알리스는 아시네토박터 노소코미알리스 GNU001(*Acinetobacter nosocomialis* GNU001)(수탁번호: KCTC 14425BP)인 것을 특징으로 하는, 플라스틱 분해 방법.

청구항 5

제2항에 있어서,

상기 바실러스 속(*Bacillus*) 균주는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) 또는 바실러스 리케니포미스(*Bacillus licheniformis*)인 것을 특징으로 하는, 플라스틱 분해 방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 바실러스 서브틸리스는 수탁번호 ATCC 6051로 기탁된 것을 특징으로 하는, 플라스틱 분해 방법.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 바실러스 리케니포미스는 수탁번호 ATCC 14580로 기탁된 것을 특징으로 하는, 플라스틱 분해 방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 배양액은 균주를 배양한 배양액 또는 이를 물리적 방법으로 여과한 배양여액인 것을 특징으로 하는, 플라스틱 분해 방법.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 균주는 플라스틱의 친수성을 증가시키는 것을 특징으로 하는, 플라스틱 분해 방법.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 플라스틱은 PET(Polyethylene terephthalate), PVC(Polyvinyl chloride), PS(Polystyrene), PP(Polypropylene) 및 PE(Polyethylene)로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 플라스틱인 것을 특징으로 하는, 플라스틱 분해 방법.

청구항 11

휴면 세포(resting cell) 또는 유사 휴면 세포(pseudo-resting cells) 상태인 플라스틱 분해능을 지니는 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는, 플라스틱 분해용 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 균주는 아시네토박터 속(*Acinetobacter*) 균주, 슈도모나스 속(*Pseudomonas*) 균주, 바실러스 속(*Bacillus*) 균주, 리시니바실러스 속(*Lysinibacillus*) 균주, 아스페르길루스 속(*Aspergillus*) 균주, 엑시구오박테리움 속(*Exiguobacterium*) 균주, 마리노박터 속(*Marinobacter*) 균주, 패니바실러스 속(*Paenibacillus*) 균주, 이디오마리나 속(*Idiomarina*) 균주 및 이디오넬라 속(*Idonella*) 균주에서 선택되는 어느 하나 이상의 균주인 것을 특징으로 하는, 플라스틱 분해용 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 아시네토박터 속(*Acinetobacter*) 균주는 아시네토박터 노소코미알리스(*Acinetobacter nosocomialis*)인 것을 특징으로 하는, 플라스틱 분해용 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 아시네토박터 노소코미알리스는 아시네토박터 노소코미알리스 GNU001(*Acinetobacter nosocomialis*

GNU001)(수탁번호: KCTC 14425BP)인 것을 특징으로 하는, 플라스틱 분해용 조성물.

청구항 15

제12항에 있어서,

상기 바실러스 속(*Bacillus*) 균주는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) 또는 바실러스 리케니포미스(*Bacillus licheniformis*)인 것을 특징으로 하는, 플라스틱 분해용 조성물.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 바실러스 서브틸리스는 수탁번호 ATCC 6051로 기탁된 것을 특징으로 하는, 플라스틱 분해용 조성물.

청구항 17

제15항에 있어서,

상기 바실러스 리케니포미스는 수탁번호 ATCC 14580로 기탁된 것을 특징으로 하는, 플라스틱 분해용 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 미생물 휴면 세포 또는 유사 휴면 세포를 이용한 플라스틱 분해 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 플라스틱 소재의 포장지 및 용기류는 우수한 기능과 저렴한 가격으로 생활의 편리성을 가져오고 산업 전반에 걸쳐 산업발달에 큰 공헌을 하지만, 플라스틱 폐기물은 현대 사회에서 가장 많이 배출되는 폐기물로 환경오염의 가장 큰 오염원 중 하나로 인식되고 있으나, 이를 분해할 수 있는 기술은 현저히 부족한 실정이다.

[0004] 플라스틱 소재로 대표적인 폴리에틸렌(PolyEthylene; PE)은 일반적으로 식품 위생성이 우수하고, 신율이 우수하여 가공성이 우수하며, 가격이 저렴한 등의 이유에 의하여 다양한 식품 용기의 내부에 코팅되어 방수 등의 목적으로 사용되고 있으나, 이를 사용한 코팅 용기 포장재는 사용 및 폐기 과정에서 플라스틱에 첨가된 가소제 등에 의한 환경 호르몬 노출 등의 사회적, 환경적 문제를 야기한다. 또한, 폴리에틸렌 코팅 용기 포장재는 사용 후 재활용을 위해 해리하는 과정에서 물에 해리되지 않는 폴리에틸렌은 선별 과정을 거쳐야 하기 때문에 재활용 비용이 증가하는 단점이 있다. 또한, 대량으로 발생하는 각종 폐비닐, 스티로폼, 플라스틱 용기 등의 소각이나 매립에 따른 환경 호르몬 노출, 맹독성의 다이옥신 검출 폐기물의 불완전 연소에 의한 대기오염 발생 등과 같은 심각한 환경오염의 원인으로 대두하고 있으며, 이러한 난분해성 플라스틱으로 인하여 전 세계적으로 환경 문제가 대두됨에 따라 자연 부하를 최소화할 수 있는 소재의 개발이 중요시되고 있으며, 자연 순환계로 돌아가 환경오염을 일으키지 않는 폴리에틸렌 등의 플라스틱 분해 방법에 대한 요구가 있다.

[0005] 이에, 본 발명자들은 미생물을 이용하는 경우, 복잡한 추가 전처리 과정 없이 플라스틱을 분해할 수 있으므로, 플라스틱 분해 능력이 있는 미생물 휴면 세포 또는 유사 휴면 세포가 플라스틱을 분해할 수 있다는 점을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허공보 제10-2383008호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 플라스틱 분해 방법을 제공하는 데 있다.

[0009] 또한, 본 발명의 다른 목적은 플라스틱 분해용 조성물을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기와 같은 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 휴면 세포(resting cell) 또는 유사 휴면 세포(pseudo-resting cell) 상태인 플라스틱 분해능을 지니는 균주 또는 이의 배양액을 플라스틱에 처리하는 단계를 포함하는 플라스틱 분해 방법을 제공한다.

[0012] 이어서, 본 발명은 휴면 세포(resting cell) 또는 유사 휴면 세포(pseudo-resting cells) 상태인 플라스틱 분해능을 지니는 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 플라스틱 분해용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명의 휴면 세포(resting cell) 또는 유사 휴면 세포(pseudo-resting cell) 상태인 플라스틱 분해능을 지니는 균주 또는 이의 배양액을 플라스틱에 처리하는 단계를 포함하는 플라스틱 분해 방법은 간단한 공정으로 유해물질을 생성하지 않으며 플라스틱을 분해할 수 있는 효과가 있다. 따라서, 본 발명에 따른 아시네토박터 노소코미알리스 GNU001(수탁번호: KCTC 14425BP), 바실러스 서브틸리스(수탁번호: ATCC 6051) 및 바실러스 리케니포미스(수탁번호: ATCC 14580)는 플라스틱 재활용을 위한 전처리 과정 또는 생물 전환 과정 등의 관련 산업 분야에 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 있어서, 아시네토박터 노소코미알리스 GNU001를 LB 액체 배지에서 CFM이 포함된 2.5 L 생물반응기로 이동한 것을 나타낸 도이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 있어서, 생물반응기로 이동 후 아시네토박터 노소코미알리스 GNU001 세포 밀도(OD_{600})를 측정한 결과를 나타낸 도이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 있어서, 생물반응기에서 진행된 LDPE 필름 분해를 나타낸 도이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 있어서, 3400 ODU 세포를 CFM 배지에 옮긴 후 용해한 후 세포 밀도(OD_{600})를 측정한 결과를 나타낸 도이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 있어서, 아시네토박터 노소코미알리스 GNU001 분리물과 함께 배양된 LDPE 필름 표면의 투명도를 나타낸 도이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 있어서, 아시네토박터 노소코미알리스GNU001 분리물과 함께 배양된 LDPE 필름 및 대조 배양에서 얻은 LDPE 필름(대조군) 필름 표면의 광 투과율을 나타낸 도이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 있어서, 아시네토박터 노소코미알리스GNU001 분리물과 함께 배양된 LDPE 필름 및 대조 배양에서 얻은 LDPE 필름(대조군) 필름 표면의 접촉각을 나타낸 도이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 있어서, 아시네토박터 노소코미알리스GNU001 분리물과 함께 배양된 LDPE 필름 및

대조 배양에서 얻은 LDPE 필름(대조군) 필름 표면의 XPS 분광법 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 9는 본 발명의 일 실시예에 있어서, 대조 배양에서 얻은 LDPE 필름(대조군) 필름 표면을 현미경으로 관찰한 결과를 나타낸 도이다.

도 10은 본 발명의 일 실시예에 있어서, 아시네토박터 노소코미알리스 GNU001 분리물과 함께 배양된 LDPE 필름 표면을 현미경으로 관찰한 결과를 나타낸 도이다.

도 11은 본 발명의 일 실시예에 있어서, 아시네토박터 노소코미알리스GNU001 분리물과 함께 배양된 LDPE 필름에서 관찰된 구멍 직경의 분포를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구현 예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현 예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허 청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

[0018] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시 예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 “포함”한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0019] 본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 '%'는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는(w/w) %, 고체/액체는(w/v) %, 그리고 액체/액체는(v/v) %이다.

[0021] 일 측면에서, 본 발명은 휴면 세포(resting cell) 또는 유사 휴면 세포(pseudo-resting cell) 상태인 플라스틱 분해능을 지니는 균주 또는 이의 배양액을 플라스틱에 처리하는 단계를 포함하는 플라스틱 분해 방법을 제공한다.

[0022] 본 발명에서 사용되는 용어 ‘휴면 세포(resting cell)’는 세포가 증식하지 않고 활성 상태를 유지하는 미생물 세포를 의미한다.

[0023] 본 발명에서 사용되는 용어 ‘유사 휴면 세포(pseudo-resting cell)’는 휴면 세포와 유사하나, 느린 증식을 포함하는 세포를 말한다.

[0024] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 균주는 아시네토박터 속(*Acinetobacter*) 균주, 슈도모나스 속(*Pseudomonas*) 균주, 바실러스 속(*Bacillus*) 균주, 리시니바실러스 속(*Lysinibacillus*) 균주, 아스페르길루스 속(*Aspergillus*) 균주, 엑시구오박테리움 속(*Exiguobacterium*) 균주, 마리노박터 속(*Marinobacter*) 균주, 패니바실러스 속(*Paenibacillus*) 균주, 이디오마리나 속(*Idiomarina*) 균주 및 이디오넬라 속(*Idonella*) 균주에서 선택되는 어느 하나 이상의 균주인 것, 바람직하게는 아시네토박터 속(*Acinetobacter*) 균주 또는 바실러스 속(*Bacillus*) 균주, 더 바람직하게는 아시네토박터 노소코미알리스 GNU001(*Acinetobacter nosocomialis* GNU001)(수탁번호: KCTC 14425BP), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)(수탁번호: ATCC 6051) 또는 바실러스 리케니포미스(*Bacillus licheniformis*)(수탁번호: ATCC 14580)일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0025] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 배양액은 균주를 배양한 배양액 또는 이를 물리적 방법으로 여과한 배양여액인 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0026] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 균주는 플라스틱의 친수성을 증가시키는 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0027] 본 발명에서 사용되는 용어 ‘친수성’은 물 분자를 좋아하는 성질이라는 뜻으로, 극성 원자가 있으면 친수성 성향을 띠게 된다.

[0028] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 플라스틱은 PET(Polyethylene terephthalate), PVC(Polyvinyl chloride), PS(Polystyrene), PP(Polypropylene) 및 PE(Polyethylene)로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 플라

스틱, 바람직하게는 PE(Polyethylene), 더 바람직하게는 LDPE(Low Density Polyethylene)인 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0030] 일 측면에서, 본 발명은 휴면 세포(resting cell) 또는 유사 휴면 세포(pseudo-resting cells) 상태인 플라스틱 분해능을 지니는 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 플라스틱 분해용 조성물을 제공한다.

[0031] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 균주는 아시네토박터 속(*Acinetobacter*) 균주, 슈도모나스 속(*Pseudomonas*) 균주, 바실러스 속(*Bacillus*) 균주, 리시니바실러스 속(*Lysinibacillus*) 균주, 아스페르길루스 속(*Aspergillus*) 균주, 엑시구오박테리움 속(*Exiguobacterium*) 균주, 마리노박터 속(*Marinobacter*) 균주, 패니바실러스 속(*Paenibacillus*) 균주, 이디오마리나 속(*Idiomarina*) 균주 및 이디오넬라 속(*Idonella*) 균주에서 선택되는 어느 하나 이상의 균주인 것, 바람직하게는 아시네토박터 속(*Acinetobacter*) 균주 또는 바실러스 속(*Bacillus*) 균주, 더 바람직하게는 아시네토박터 노소코미알리스 GNU001(*Acinetobacter nosocomialis* GNU001)(수탁번호: KCTC 14425BP), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)(수탁번호: ATCC 6051) 또는 바실러스 리케니포미스(*Bacillus licheniformis*)(수탁번호: ATCC 14580)일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0033] 이상에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 구체적인 실시예를 상세하게 설명되었으나, 본 발명의 사상을 이해하는 당업자는 동일한 사상의 범위 내에서 다른 구성요소를 추가, 변경, 삭제 등을 통하여, 퇴보적인 다른 발명이나 본 발명 사상의 범위 내에 포함되는 다른 실시예를 용이하게 제안할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상술한 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구의 범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구의 범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

[0035] **<준비예 1> 폴리에틴렌(PolyEthylene; PE) 수집**

[0036] 폴리에틸렌(PolyEthylene; PE) 폐기물은 플라스틱 함유 매립지에서 수집하였으며, 필름 폐기물은 온실 이전 및 재배치 과정에서 사용된 30년 된 PE 필름이 포함된 매립지에서 수집하였다. 해당 폐기물은 20년 넘게 매립되어 있었으며, 최근 발굴되어 2년 이상 지면에 노출되었다. 멸균 처리된 50 mL 원뿔형 튜브를 사용하여 지면에 노출된 폐기물 PE 샘플을 수집하였다. 수집된 샘플은 즉시 미생물 분리에 사용되었으며, 나머지 조각은 작은 조각으로 절단하여 -80 ℃에서 보관하여 추가적인 박테리아 분리에 사용되었다. 분리된 박테리아는 아시네토박터 노소코미알리스 GNU001(*Acinetobacter nosocomialis* GNU001)(수탁번호: KCTC 18879P)인 것으로 확인되었다.

[0038] **<실험예 1> *A. nosocomialis* GNU001 유사 휴면 세포(pseudo-resting cell) 발달을 위한 배양 조건 최적화**

[0039] 아시네토박터 노소코미알리스 GNU001(*Acinetobacter nosocomialis* GNU001)(수탁번호: KCTC 18879P) 균주는 LDPE 필름 표면을 산화시킬 수 있는 잠재력이 있으나, 이는 7개월이 소요되어, 미생물 활동만으로 LDPE 필름을 효율적으로 분해하는데 상당한 시간이 소요된다. 이러한 느린 분해는 하나 또는 두 가지 요인의 조합으로 인한 것으로 추정된다. 첫 번째 요인은 LDPE 필름이 유일한 탄소원일 때, *A. nosocomialis* 세포의 낮은 증식 속도이며, 두 번째 요인은 분리된 *A. nosocomialis* GNU001이 에너지원으로 사용될 수 있는 LDPE 필름의 작은 분자가 느리게 방출된다는 점이다. 실제로, 단일 군집 접종을 통해 LDPE 필름 조각이 첨가된 CFM을 포함하는 시험관에서 7개월 동안 *A. nosocomialis* GNU001 균주의 세포 밀도(OD_{600})가 0.01미만임을 확인하였다.

[0041] LDPE 분해는 며칠에서 몇 주가 걸리므로, 비성장 배지에 휴면 세포를 사용하는 것보다 화학적으로 정의된 배지에 휴면 세포를 사용하는 것이 적절하다고 판단되었다. 유사 휴면 세포 발달을 위한 최적의 세포 수를 결정하기 위하여, 광학 밀도 단위(Optical Density Units; ODU)가 850, 1700 및 3400인 *A. nosocomialis* GNU001 세포를 LB 액체 배지에서 LDPE 필름이 첨가되었으며 CFM이 포함된 2.5 L 생물반응기로 이동하였다(도 1 참조).

[0042] 생물반응기(MARADO-05S-PB, CNS, Daejeon, Korea)는 121 ℃에서 15분 동안 멸균되었으며, 용존산소(DO)와 pH를 감지하기 위해 교정된 프로브가 장착되었다. 별도로 명시되지 않는 한 발효는 LB 액체 배지 또는 CFM 배지를 사

용하여 2.5 L 용량에서 수행되었다. LB 액체 배지가 사용 될 때의 DO는 DO stat 모드로 제어되어 DO 수준이 50% 이상을 유지하였다. 반면, CFM 배지가 사용될 때는 공기흡입을 조절하여 최소한 50% 이상의 DO 수준을 유지하였다. 또한, 탄소원으로 LDPE 필름(3.5 cm x 20 cm 및 3.5 cm x 7 cm)이 CFM 배지에 첨가되었다. *A. nosocomialis*의 단일 군집이 시험관의 5 mL LB 액체 배지에서 밤새도록 배양되었으며, 배양물 중 1 mL를 250 mL의 LB 액체 배지가 든 1 L 플라스크로 옮겨 담아 세포를 37 ℃에서 200 rpm으로 배양하였으며, OD_{600}이 약 1에 도달할 때까지 기다렸다. 이 배양물은 3.75 L의 LB 액체 배지가 든 발효기에 대한 접종물로 사용되었다. LB 액체 배지를 포함하는 발효기에서 배양된 세포는 CFM 배지가 든 주요 발효기로 이동되었으며, 얼음 위에 놓인 후, 4 ℃에서 10분 동안 6,000 rpm에서 원심분리하여 CFM 배지로 두 번 세척되었다. OD_{600}이 약 1인 0.85, 1.7 및 3.4 L의 세포를 원심분리로 수집하여 850, 1700 및 3400 광학 밀도 단위(ODU)로 지정하였다. 세포 밀도(OD_{600})가 1에 가까울 때 세포를 수확하고, 측정된 세포 밀도를 바탕으로 정확한 수확량을 계산하였다.

[0043] 생물반응기로 이동 후, 세포 밀도(OD_{600})를 측정하여 도 2에 나타내었다.

[0044] 도 2에서 보듯이, 세포 이동 후 초기 OD_{600}은 ODU가 850, 1700 및 3400인 *A. nosocomialis* GNU001 세포 각각 0.34(도 2f 검정 세모), 0.68(도 2f 흰 네모) 및 1.36(도 2f 검정 네모)이며, 850, 1700 및 3400 ODU의 세포를 포함하는 모든 생물반응기는 용해로 인해 세포 밀도가 감소하였다. 850 및 1700 ODU 세포가 있는 생물반응기에서는 유의미한 세포 회복이 관찰되지 않은 반면, 3400 ODU 세포가 있는 생물반응기에서는 68시간에 최대 0.492의 회복을 보여주었다. 3400 ODU 세포를 함유한 생물반응기는 초기에 이동된 세포의 33% 회수율을 보여주었다.

[0045] 이를 통해, 유사 휴면 세포 발달을 위한 최적의 세포 수는 3400 ODU인 것을 확인하였다.

[0047] **<실험예 2> *A. nosocomialis* GNU001 유사 휴면 세포를 이용한 폴리에틸렌(PolyEthylene; PE) 필름 분해능 분석**

[0048] **2-1. 광 투과율 분석**

[0049] LDPE 필름 분해는 화학적으로 정의된 CFM 배지를 사용하여 2.5L 생물반응기에서 진행되었으며, 이 과정에서 *A. nosocomialis* GNU001 유사 휴면 세포에 의해 촉매되었다(도 3a 및 b 참조). 상기 실험예 1에서 선정한 최적 세포 수인 3400 ODU 세포를 CFM 배지에 옮긴 후, 60시간 동안 용해한 결과, 세포 밀도(OD_{600})는 0.34가 되었다(도 4 참조). 그 후, 세포 밀도(OD_{600})는 211시간에 0.66으로 증가하였으며, 521시간까지 지속되었다. 촉매 반응은 *A. nosocomialis* GNU001 유사 휴면 세포를 사용하여 사망 단계에 들어갈 때까지 지속되었으며, 이를 672시간(28일) 동안 모니터링 하였다. 대조군으로는 동일한 조건에서 CGSC에서 구입한 *Escherichia coli* 세포를 사용하여 생물반응기를 작동하였다.

[0050] 생물반응기에서 28일 동안 LDPE 필름 분해를 진행한 후, 광 투과율, 접촉각, XPS 및 현미경 데이터를 통해 분해 능력을 확인하였다.

[0051] LDPE 필름의 광 투과율을 측정하기 위하여, Koptri Institute(Seoul, South Korea)의 UV/Vis 분광 광도계(V-730, JASCO, Japan)를 사용하여 측정하였으며, 스펙트럼은 400 nm/min의 스캔 속도로 200~1,100 nm에서 얻어졌다. 광 투과율 측정을 위한 시료 준비 과정으로 LDPE 필름을 2% SDS에 1일 동안 담가 세척한 후, 멸균수로 두 번 세척하고 에탄올로 한 번 세척하여 생물막 및 세포를 제거하였으며, 광 투과율 측정 결과를 도 5 및 6에 나타내었다.

[0052] 도 5에서 보듯이, 대조군 필름(도 5a)은 불투명도가 증가하지 않았으나, *A. nosocomialis* GNU001 분리물과 함께 배양된 LDPE 필름 표본(도 5b)의 불투명도가 증가한 것이 관찰되었으며, 이는 필름이 3중으로 적층되었을 때 더 두드러지게 나타났다.

[0053] 도 6에서 보듯이, *A. nosocomialis* GNU001 분리물과 함께 배양된 LDPE 필름의 광 투과율은 모든 자외선(UV; 200-380 nm), 가시광선(380-780 nm) 및 근적외선(NIR; >780 nm) 스펙트럼에서 대조군 필름보다 낮게 나타났으며, 투과율의 감소는 근적외선 영역보다 자외선 영역에서 더 뚜렷하게 나타났다.

[0054] 이를 통해, *A. nosocomialis* GNU001 분리물과 함께 배양된 LDPE 필름의 분해가 진행되어, 불투명도가 증가하였으며 투과율이 낮게 나타난 것을 확인하였다.

[0056] **2-2. 접촉각 분석**

[0057] *A. nosocomialis* GNU001의 LDPE 필름 분해 능력을 확인하기 위하여, 필름의 소수성을 접촉각 분석을 통해 측정하였다.

[0058] LDPE 필름의 소수성은 Phoenix 300 Touch 기기(SEO, Korea)를 사용하여 물 접촉각을 측정하였으며, 물 접촉각은 각 LDPE 필름의 5개의 서로 다른 영역에서 측정되었다. 접촉각 분석을 위한 시료 준비 과정은 상기 실험예 2-1과 동일하게 진행되었으며, 물 접촉각 측정 결과를 도 7에 나타내었다.

[0059] 도 7에서 보듯이, *A. nosocomialis* GNU001 분리물과 함께 배양된 LDPE 필름(도 7b)에서 물 접촉각은 93.7° 이며, 대조군 필름(도 7a)은 99.9° 로 나타났다. *A. nosocomialis* GNU001 분리물과 함께 배양된 LDPE 필름의 접촉각은 대조군 필름에 비해 6% 낮게 나타났다.

[0060] 이를 통해, *A. nosocomialis* GNU001 분리물과 함께 배양된 LDPE 필름의 표면은 대조군 필름의 표면보다 더 친수성임을 확인하였다.

[0062] **2-3. X선 광전자(XPS) 분광법 분석**

[0063] *A. nosocomialis* GNU001의 LDPE 필름 분해 능력을 확인하기 위하여, XPS 분광법을 통해 분석하였다.

[0064] XPS 분광계(K-ALPHA, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 사용하여 X선 광전자 스펙트럼을 수집하여 탄소-탄소, 탄소-산소 및 탄소-수소 결합의 존재를 확인하였다. C1s 피크는 280-300 eV 범위에 맞추어 분석되었다.

[0065] XPS 분광법 분석을 위한 시료 준비 과정은 상기 실험예 2-1과 동일하게 진행되었다. XPS 분광법 측정 결과를 도 8에 나타내었다.

[0066] 도 8에서 보듯이, *A. nosocomialis* GNU001 분리물과 함께 배양된 LDPE 필름은 대조군 필름에 비해 산소 함량이 높게 측정되었으며, 이는 O1s/C1s 비율이 20%로, 대조군 필름에 비해 4.3배 더 높은 값이다. 이는 286.4 eV 및 288.7 eV에서 관찰된 C-O 및 C=O 피크에 의해 측정되었다. 특히, C=O를 나타내는 288.7 eV 피크는 *A. nosocomialis* GNU001 분리물과 함께 배양된 LDPE 필름에서만 측정되었다.

[0067] 이를 통해, *A. nosocomialis* GNU001 분리물과 함께 배양된 LDPE 필름의 분해가 진행되어, 산화된 것을 확인하였다.

[0069] **2-4. 필름 표면 형태 분석**

[0070] *A. nosocomialis* GNU001의 LDPE 필름 분해 능력을 확인하기 위하여, LDPE 필름의 표면 형태를 측정하였다.

[0071] LDPE 필름 표면 형태는 편광 현미경(BX50, Olympus, Tokyo, Japan)을 사용하여 측정하였으며, 표면의 구멍 형성, 균열 및 거칠기와 같은 물리적 변화를 분석하였다. LDPE 필름 표면의 생물막 존재 여부는 샘플을 금으로 코팅한 후 주사전자현미경(SEM; JSM-7610F, JEOL, Japan)을 사용하여 분석하였다.

[0072] 도 9에서 보듯이, 대조군 필름의 표면을 200X 배율의 현미경으로 관찰한 결과, 주조 공정으로 인해 약간의 긁힘이 있으나, 대체적으로 매끄러운 것으로 나타났다.

[0073] 도 10에서 보듯이, *A. nosocomialis* GNU001 분리물과 함께 배양된 LDPE 필름을 200X 배율의 현미경으로 관찰한 결과, 거친 표면 구조를 나타내었다. 또한, *A. nosocomialis* GNU001 분리물과 함께 배양된 LDPE 필름의 표면에는 대조군 필름에는 존재하지 않았던 구멍이 관찰되었다. 217 cm^2 LDPE 필름 표면의 구멍을 분석한 결과, 구멍은 약 39개 존재했으며, 가장 큰 구멍의 직경은 1,440 ㎛였다. 구멍 직경의 분포를 도 11에 나타내었으며, 13.5~1,440 ㎛범위로 균일하였다.

[0074] 이를 통해, *A. nosocomialis* GNU001 콜로니 접종 후 7개월 배양 실험에서는 LDPE 필름 표면이 부분적으로 산화되는 것을 확인한 반면, 유사 휴면 세포를 이용하여 LDPE 분해 능력을 측정한 결과에서는 LDPE 필름 분해가 상당히 가속화된 것을 확인하였다.

[0076] **<실험예 3> *B. subtilis* ATCC 6051 및 *B. licheniformis* ATCC 14580 유사 휴면 세포를 이용한 폴리에틴렌(PolyEthylene; PE) 필름 분해능 분석**

[0077] **3-1. Fourier 변환 적외선(FT-IR) 분광법 분석**

[0078] 또한, 아시네토박터 노소코미알리스 GNU001(*Acinetobacter nosocomialis* GNU001)(수탁번호: KCTC 18879P)이 아닌 플라스틱 분해능을 지니는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)(수탁번호: ATCC 6051) 및 바실러스 리케니포미스 (*Bacillus licheniformis*)(수탁번호: ATCC 14580)의 휴면세포의 LDPE 분해 능력을 측정하였다. LDPE 필름 표면의 작용기 변화를 분석하기 위하여, FT-IR 분광법을 통해 분석하였다.

[0079] LDPE 필름 표면에 존재하는 작용기는 FT-IR 분광계((IS50, Thermo Fisher, Waltham, USA)를 이용한 감쇠 총 반사 FT-IR 변환 적외선(ATR-FTIR) 분광법을 사용하여 결정되었다. FT-IR 분석을 위한 시료 준비 과정은 상기 실험예 2-1과 동일하게 진행되었다.

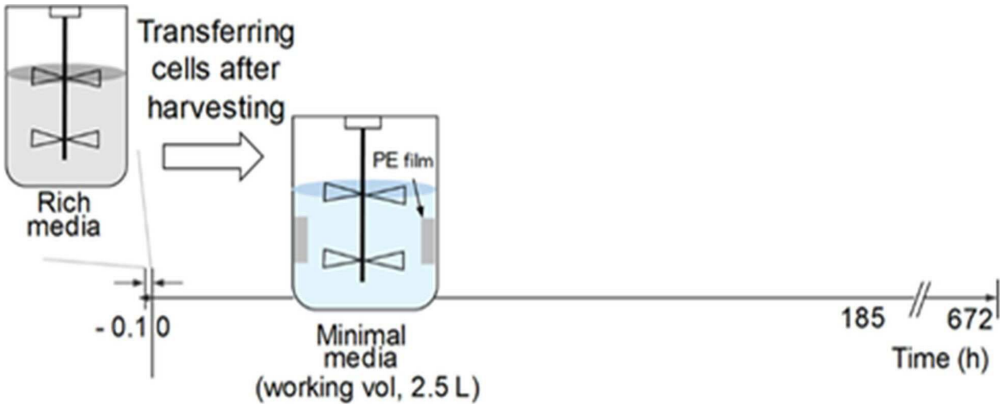
[0080] 플라스틱 필름의 표면의 스펙트럼에서 1030.65 cm^{-1}에서 새로운 피크가 관찰되었다. 이는 에스테르, 에테르 및 카르복실산에 존재하는 C-O 스트레칭을 나타낸다. 이외에도 2851 cm^{-1} 및 2922 cm^{-1}에서 피크의 감소를 나타냈으며, 이는 $=CH_2$ 신축이 약화되었음을 나타낸다.

[0081] 이를 통해, 휴면세포를 이용한 플라스틱 분해 방법은 *A. nosocomialis* 균주에만 국한되지 않으며, 범용적으로 사용될 수 있음을 확인할 수 있다.

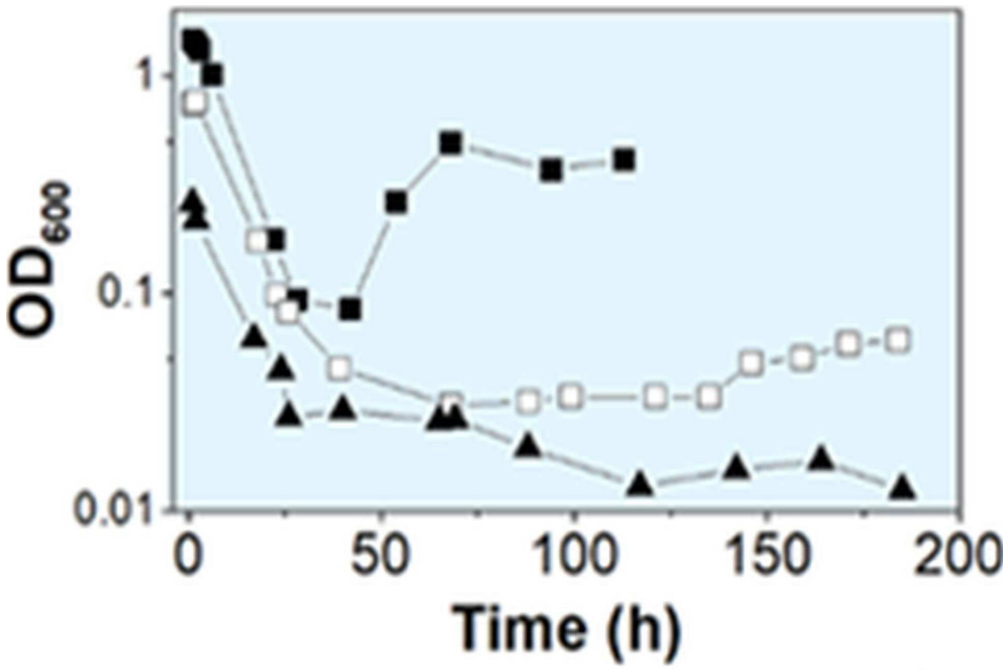
[0083] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예, 실험예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시 예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구 범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

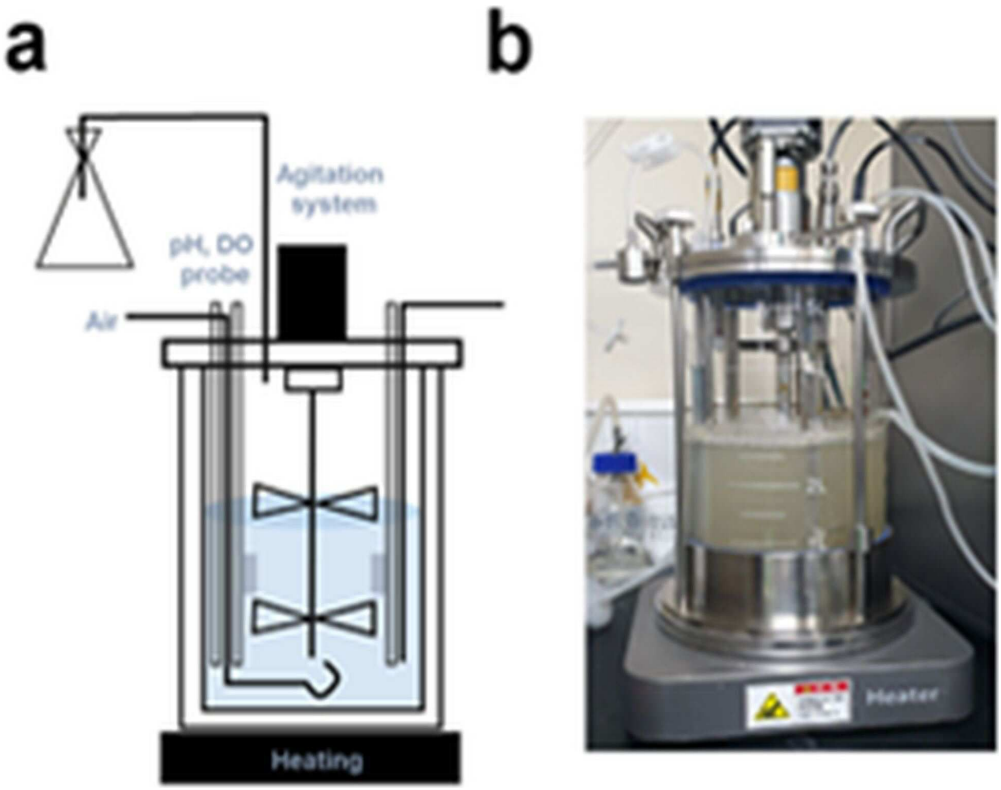
도면1



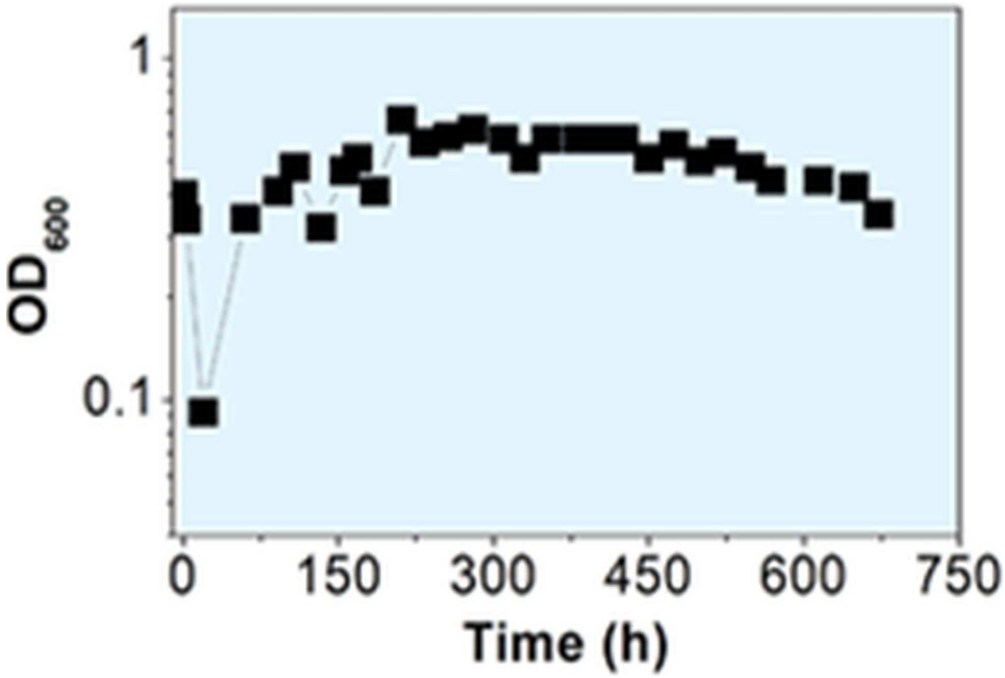
도면2


1
0.1
0.01
OD600
0
50
100
150
200
Time (h)

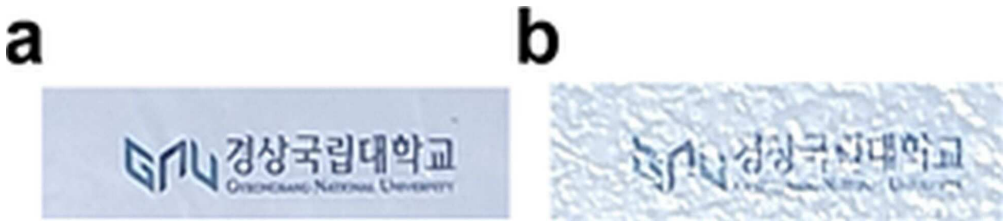
도면3


a
b
Agitation system
pH, DO probe
Air
Heating
Heater

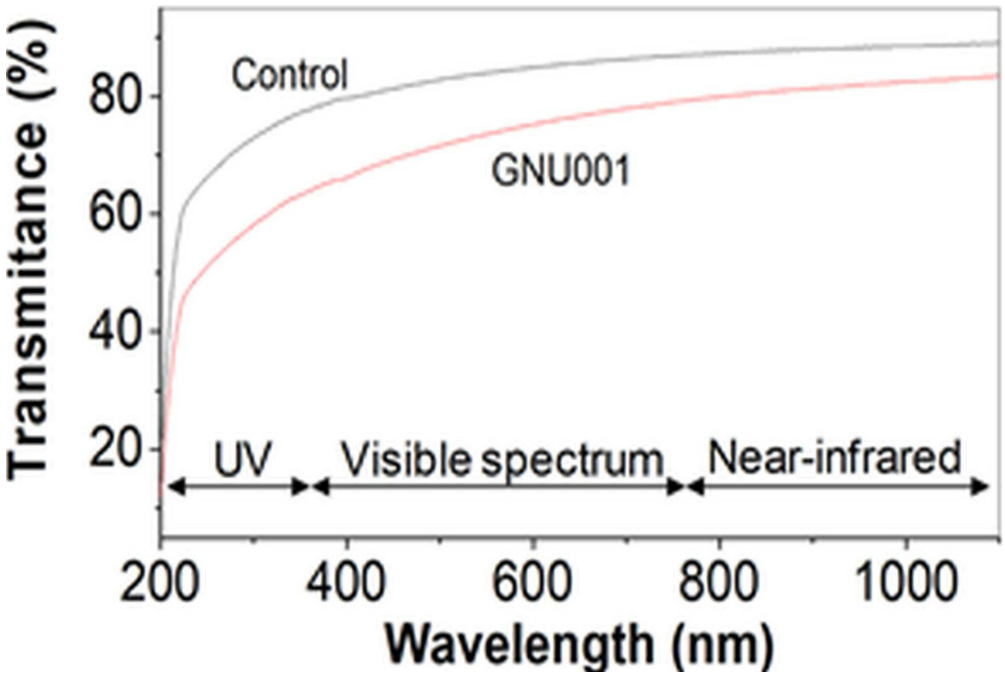
도면4


1
0.1
OD600
0
150
300
450
600
750
Time (h)

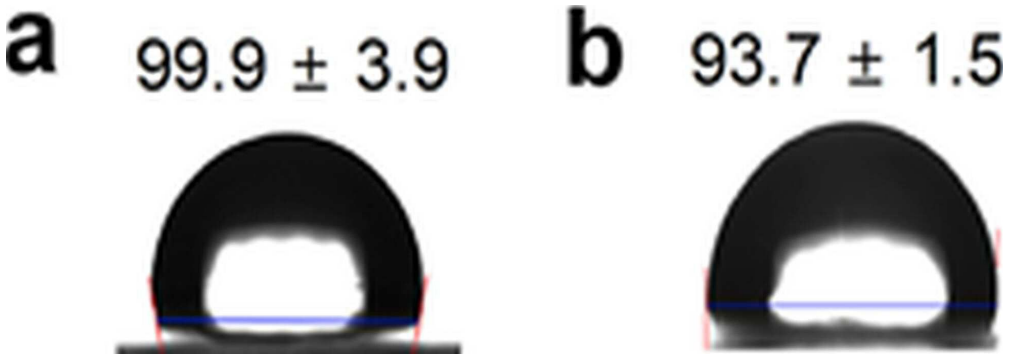
도면5


a
b
경상국립대학교

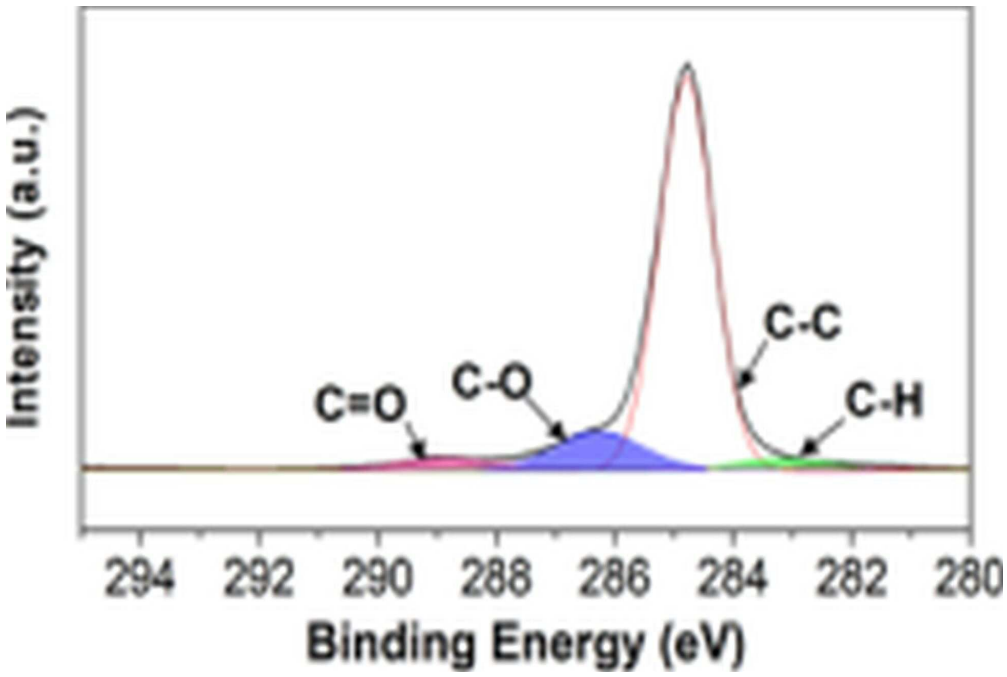
도면6


Control
GNU001
Transmitance (%)
80
60
40
20
UV
Visible spectrum
Near-infrared
200
400
600
800
1000
Wavelength (nm)

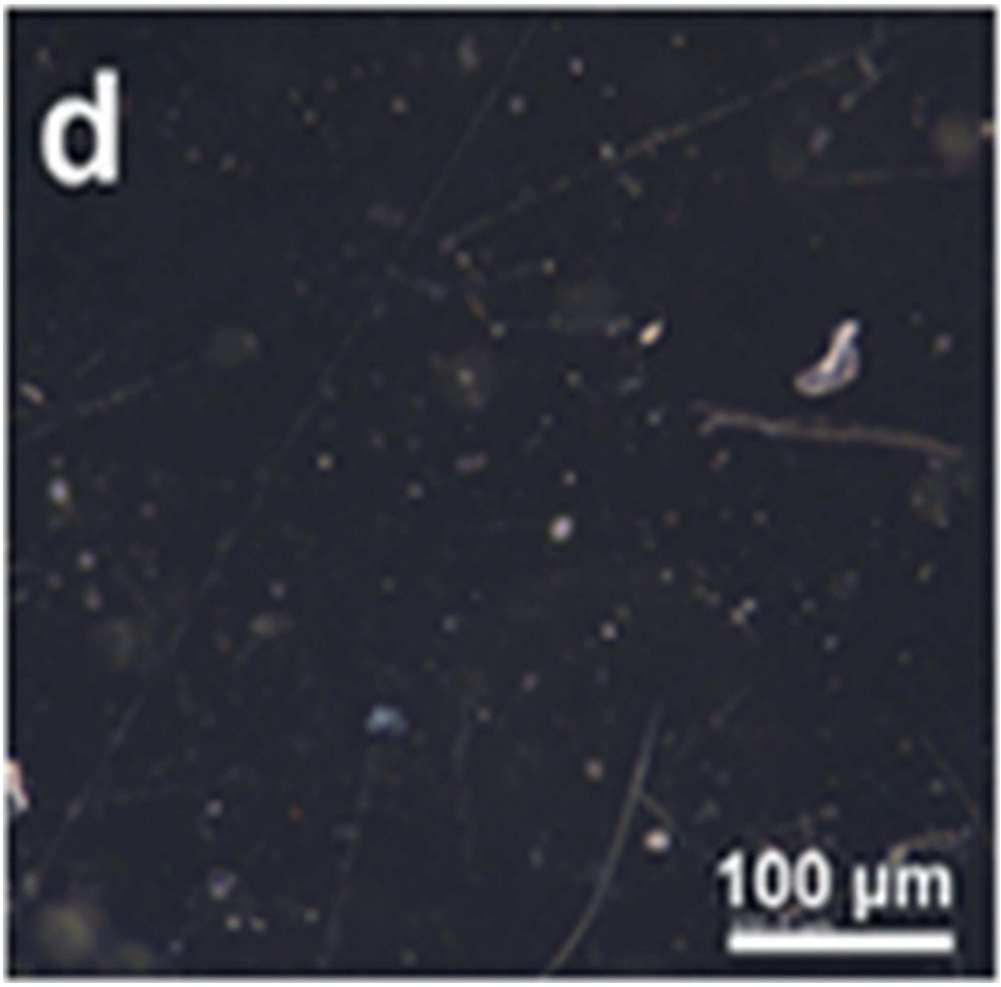
도면7


a
99.9 ± 3.9
b
93.7 ± 1.5

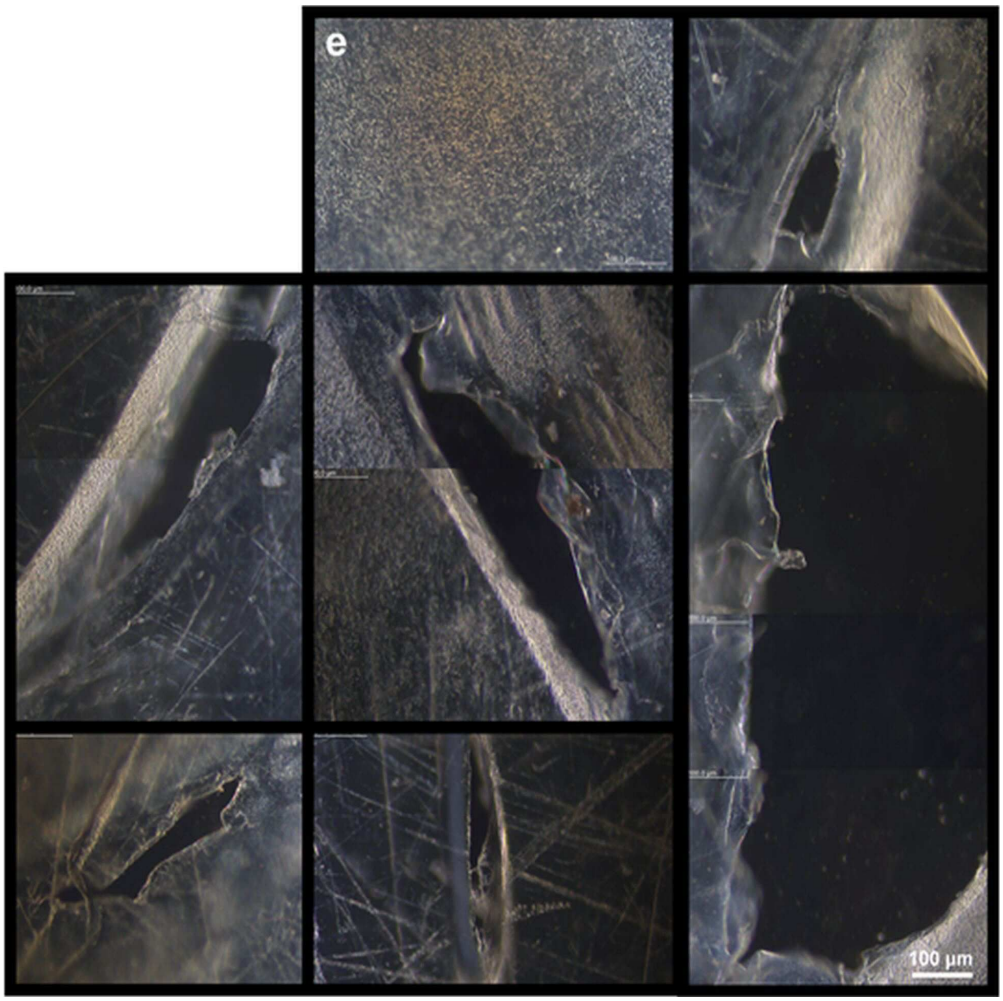
도면8


Intensity (a.u.)
C=O
C-O
C-C
C-H
294
292
290
288
286
284
282
280
Binding Energy (eV)

도면9



도면10



도면11

