

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2021년 5월 14일 (14.05.2021)



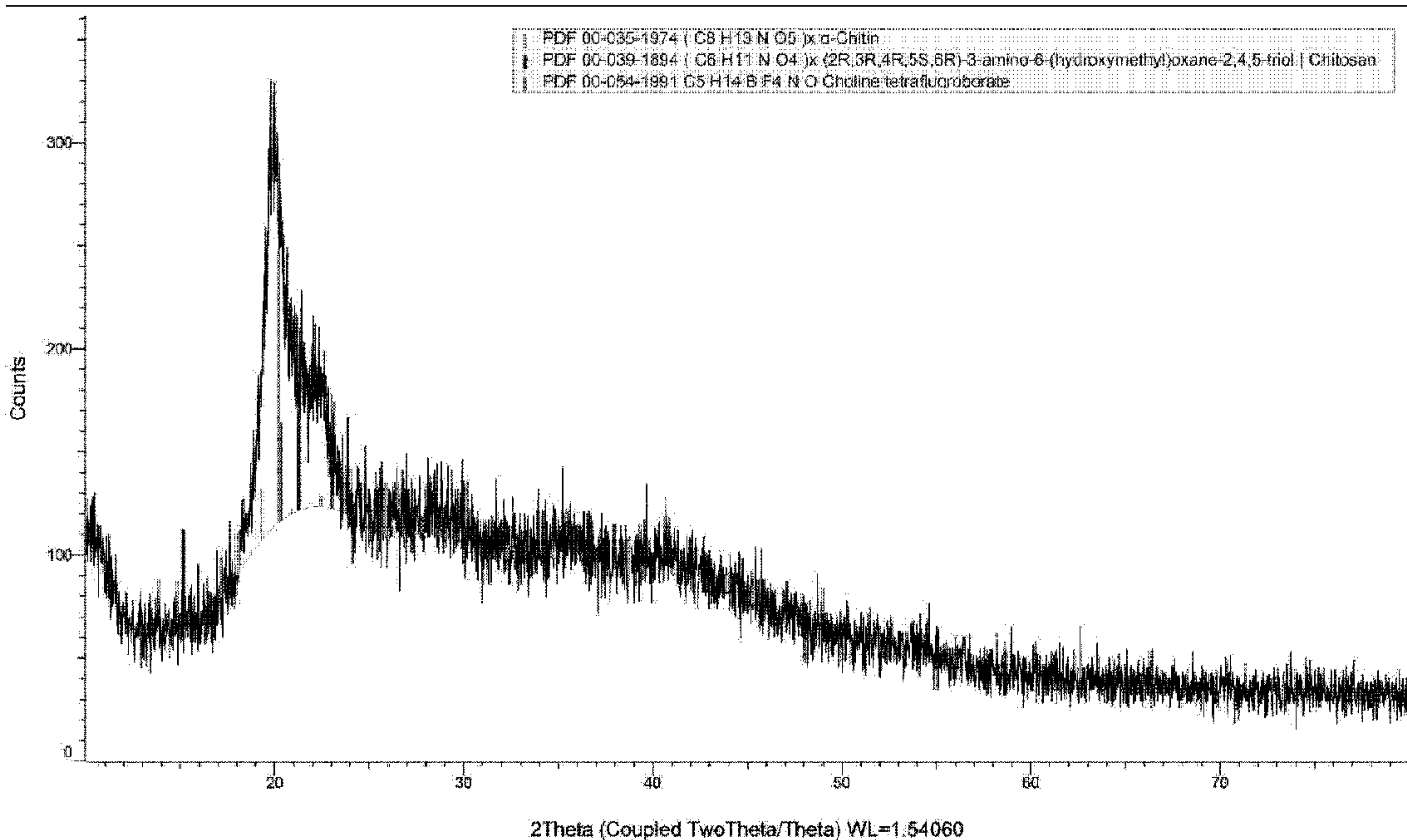
(10) 국제공개번호
WO 2021/090982 A1

- (51) 국제특허분류: **C12P 19/04** (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2019/015019
- (22) 국제출원일: 2019년 11월 7일 (07.11.2019)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (71) 출원인: 농업회사법인푸드웜주식회사 (**FOODY-WORM, INC.**) [KR/KR]; 27867 충청북도 진천군 문백면 은진로 64-2, Chungcheongbuk-do (KR).
- (72) 발명자: 김태훈 (**KIM, Tae Hoon**); 28160 충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명1로 194-25, 4층, Chungcheongbuk-do (KR). 권민정 (**KWON, Min Jeong**); 28160 충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명1로 194-25, 4층, Chungcheongbuk-do (KR). 정병욱 (**JUNG, Byung Ok**); 28160 충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명1로 194-25, 4층, Chungcheongbuk-do (KR). 이유석 (**LEE, You Seok**); 28160 충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명1로 194-25, 4층, Chungcheongbuk-do (KR).
- (74) 대리인: 황이남 (**HWANG, E-Nam**); 05836 서울시 송파구 법원로 127, 1317호, 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, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD,

(54) Title: METHOD FOR PREPARING BLACK SOLDIER FLY-DERIVED CHITOSAN

(54) 발명의 명칭: 동애등에 유래 키토산의 제조방법

(Coupled TwoTheta/Theta)



(57) Abstract: The present invention relates to a method for preparing black soldier fly-derived chitosan comprising the steps of: I) killing black soldier fly larvae by heating and drying by means of microwaves; II) grinding and compressing the dead black soldier fly larvae; III) extracting chitin from the ground and compressed black soldier fly larvae by means of enzyme hydrolysis or microbial fermentation; and IV) obtaining chitosan by deacetylating the extracted chitin. According to the present invention, chitosan exhibiting high purity and deacetylation level can be prepared by carrying out the pretreatment processes of killing, grinding, compressing and the like, extracting chitin from the black soldier fly larvae by means of a biological process, and deacetylating same.

SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, 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, 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))

(57) 요약서: 본 발명은 I) 동애등에 유충을 살아있는 채로 마이크로웨이브에서 가열건조하면서 도살하는 단계; II) 상기 도살된 동애등에 유충을 분쇄 및 압착하는 단계; III) 상기 분쇄 및 압착된 동애등에 유충으로부터 효소가수분해 또는 미생물 발효 공정에 의해서 키틴을 추출하는 단계; 및 IV) 상기 추출된 키틴을 탈아세틸화하여 키토산을 수득하는 단계; 를 포함하는 동애등에 유래 키토산의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 동애등에 유충으로부터 도살, 분쇄 및 압착 등의 전처리 과정을 거친 후, 생물학적 공정에 의하여 키틴을 추출하고, 이를 탈아세틸화 함으로써 순도 및 탈아세틸화도가 높은 키토산을 제조할 수 있다. {대표도} 도 3

명세서

발명의 명칭: 동애등에 유래 키토산의 제조방법

기술분야

- [1] 본 발명은 동애등에 유래 키토산의 제조방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 동애등에 유충으로부터 도살, 분쇄 및 압착 등의 전처리 과정을 거친 후, 생물학적 공정에 의하여 키토신을 추출하고, 이를 탈아세틸화하여 키토산을 제조하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 키토신은 N-아세틸-D-글루코사민 단위가 베타결합(1→4)으로 연결된 구조로서 셀룰로오스에 이어 지구상에서 2번째로 많은 다당류이다. 이러한 키토신은 주로 갑각류나 곤충의 외골격 또는 진균이나 세균 등의 세포벽 일부를 구성하는 성분인데, 전통적으로는 게, 새우 등의 갑각류로부터 염산 용액 및 수산화나트륨 용액으로 처리하여 키토신을 얻는 화학적 추출방법이 주류를 이루었다. 그러나 상기 화학적 추출방법에 사용되는 화학물질은 환경 및 인체에 유해한 것이고, 특히 수산화나트륨 용액으로 처리하는 단백질 제거 공정은 고온이 필요하여 에너지 소모가 많으며, 세척공정에서도 다량의 오염폐수를 배출함에 따라 재활용이 어려워 비용이 많이 드는 단점이 있다. 아울러 키토신의 화학적 추출방법에 의하면 그 공정 중에 키토신이 변성할 가능성이 존재하여 키토신의 순도가 떨어지는 문제점도 있다.
- [3] 따라서 최근에는 상술한 키토신의 화학적 추출방법에 따른 문제점을 해소하고자 효소가수분해 또는 미생물 발효에 의한 생물학적 추출방법이 각광을 받고 있다. 게다가 곤충산업 시장이 크게 성장하고, 게, 새우 등의 갑각류에 의한 알러지 반응을 피하기 위하여 곤충 유충의 외피에서 유래한 키토신의 추출에 대하여 많은 연구가 이루어지고 있는 실정이다.
- [4] 그런데 곤충 유충의 외피에서 유래한 키토신의 생물학적 추출방법에 있어서도 키토신의 순도 및 키토산으로 전환하는 과정에서 탈아세틸화도에 영향을 미치는 전처리 공정에 대해서는 구체적으로 알려진바 없다.
- [5] 그러므로 본 발명자 등은 곤충에서 유래한 키토신을 생물학적으로 추출하는 공정을 연구하는 중에, 효소가수분해 또는 미생물 발효와 같은 생물학적 공정을 수행하기 전에 동애등에의 유충으로부터 특별한 도살, 분쇄 및 압착 등의 전처리 과정을 거치면 키토신의 순도뿐만 아니라, 키토산으로 전환하는 과정에서 탈아세틸화도를 높일 수 있음을 발견하고 본 발명을 완성하기에 이르렀다.
- [6] {선행기술문헌}
- [7] [특허문헌]
- [8] 공개특허공보 제10-2003-0013804호
- [9] 공개특허공보 제10-2015-0113318호

[10] 공개특허공보 제10-2018-0069310호

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[11] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 감안하여 안출된 것으로, 본 발명의 목적은 동애등에 유충으로부터 도살, 분쇄 및 압착 등의 전처리 과정을 거친 후, 생물학적 공정에 의하여 키틴을 추출하고, 이를 탈아세틸화하여 순도 및 탈아세틸화도가 높은 키토산을 제조하는 방법을 제공하고자 하는 것이다.

과제 해결 수단

[12] 상기와 같은 목적을 달성하기 위한 본 발명은,

[13] I) 동애등에 유충을 살아있는 채로 마이크로웨이브에서 가열건조하면서 도살하는 단계;

[14] II) 상기 도살된 동애등에 유충을 분쇄 및 압착하는 단계;

[15] III) 상기 분쇄 및 압착된 동애등에 유충으로부터 효소가수분해 또는 미생물 발효 공정에 의해서 키틴을 추출하는 단계; 및

[16] IV) 상기 추출된 키틴을 탈아세틸화하여 키토산을 수득하는 단계;를 포함하는 동애등에 유래 키토산의 제조방법을 제공한다.

[17] 상기 마이크로웨이브에서 가열건조 과정은 70~80°C로 0.5~1시간 동안 수행하는 것을 특징으로 한다.

[18] 상기 분쇄 및 압착 과정은 분쇄기를 사용하여 동애등에 유충의 입자를 150~200 μm 크기로 조절한 후, 이중 스크류 압착기로 압착하는 것을 특징으로 한다.

[19] 상기 효소가수분해 공정에 사용되는 효소는 단일 프로테아제 또는 프로테아제의 혼합물인 것을 특징으로 한다.

[20] 상기 프로테아제는 아미노펩티다제, 메탈로카르복시펩티다제, 세린 엔도펩티다제, 시스테인 엔도펩티다제, 아스파르트산 엔도펩티다제 및 메탈로엔도펩티다제로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 것을 특징으로 한다.

[21] 상기 효소가수분해 공정은 pH 1.5~2.5의 산성 매질 하에서 35~40°C로 5~10시간 동안 수행하는 것을 특징으로 한다.

[22] 상기 미생물 발효 공정에 사용되는 미생물은 젖산 생성 미생물 및 프로테아제 생성 미생물의 혼합물인 것을 특징으로 한다.

[23] 상기 젖산 생성 미생물은 락토바실러스 속 또는 사카로마이세스 속 미생물인 것을 특징으로 한다.

[24] 상기 프로테아제 생성 미생물은 바실러스 속, 슈도모나스 속, 슈도알테로모나스 속, 스트렙토마이세스 속, 브레비박테리움 속 또는 마이크로코커스 속 미생물인 것을 특징으로 한다.

[25] 상기 미생물 발효 공정은 30~40°C로 5~7일 동안 수행하는 것을 특징으로 한다.

[26] 상기 탈아세틸화 반응과정은 20~70 중량% 농도의 수산화나트륨 용액으로

60~100°C에서 4~24시간 동안 수행하는 것을 특징으로 한다.

[27] 본 발명에 따라 제조된 키틴은 순도 80%, 바람직하게는 순도 85% 이상일 수 있다.

[28] 또한, 본 발명에 따라 제조된 키틴은 탈아세틸화도가 90%, 바람직하게는 95% 이상일 수 있다.

[29] 키틴의 순도 및 탈아세틸화도가 높아질수록 고품질의 키토산을 제조할 수 있으므로, 키틴의 순도 및 탈아세틸화도가 높을수록 바람직하다.

[30] 또한, 본 발명에 따라 제조된 키토산은 α , β , γ 키토산일 수 있으나, 바람직하게는 α 키토산일 수 있다.

발명의 효과

[31] 본 발명에 따르면, 동애등에 유충으로부터 도살, 분쇄 및 압착 등의 전처리 과정을 거친 후, 생물학적 공정에 의하여 키틴을 추출하고, 이를 탈아세틸화함으로써 순도 및 탈아세틸화도가 높은 키토산을 제조하는 방법을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[32] 도 1은 본 발명에 따라 동애등에의 유충으로부터 키토산을 제조하는 방법을 단계별로 나타낸 개략적인 공정도를 나타낸 것이다.

[33] 도 2는 본 발명에 따른 키틴의 XRD 분석 결과를 나타낸 것이다.

[34] 도 3은 본 발명에 따른 키토산의 XRD 분석 결과를 나타낸 것이다.

[35] 도 4는 본 발명에 따른 키토산의 NMR 분석 결과를 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 형태

[36] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.

[37] 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.

[38] 본 발명은 I) 동애등에 유충을 살아있는 채로 마이크로웨이브에서 가열건조하면서 도살하는 단계;

[39] II) 상기 도살된 동애등에 유충을 분쇄 및 압착하는 단계;

[40] III) 상기 분쇄 및 압착된 동애등에 유충으로부터 효소가수분해 또는 미생물 발효 공정에 의해서 키틴을 추출하는 단계; 및

[41] IV) 상기 추출된 키틴을 탈아세틸화하여 키토산을 수득하는 단계;를 포함하는 동애등에 유래 키토산의 제조방법을 제공한다.

[42] 동애등에는 파리 목(Diptera) 동애등에 과(Stratiomyidae)에 속하는 곤충들을 총칭하는 것으로 전 세계적으로 약 1,500종이 알려져 있으며, 우리나라의 경우에는 9속 14종이 보고되어 있다. 특히, 동애등에의 유충은 육식 또는 초식성으로 다양한 서식지(물이나 썩은 유기물질, 야채 등)에 서식하고 있다.

[43] 또한, 동애등에의 유충은 대량사육과 냉동보관이 쉬워 사료 첨가제, 비료, 바이오디젤 등 다양한 분야에 응용되고 있다. 게다가 이러한 동애등에의 유충은

그 외피에 키틴 성분을 함유하고 있어 최근에는 동애등에의 유충으로부터 키틴을 추출하는 공정에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

[44] 그러나 동애등에와 같은 곤충으로부터 키틴을 추출하는 방법으로서는 곤충을 염산 용액으로 처리하여 탈회를 비롯한 무기물 제거 과정 및 수산화나트륨 용액으로 처리하여 단백질을 제거하는 과정 등 전통적인 화학적 추출공정 위주로 공지되어 있다.

[45] 또한, 곤충으로부터 키틴을 추출할 수 있는 효소가수분해 또는 미생물 발효에 의한 생물학적 추출공정의 경우에도 대부분 효소가수분해 또는 미생물 발효 과정의 조건(농도, 온도, 시간 등)은 크게 다를 바 없이 효소 또는 미생물의 종류를 달리하여 키틴의 추출효과를 실험하는 것에 집중되어 있을 뿐, 추출한 키틴의 순도 및 그 키틴을 키토산으로 전환 시 중요한 인자인 탈아세틸화도에 영향을 미치는 곤충의 전처리 공정에 대해서는 구체적으로 알려진 바 없다.

[46] 아래에서는 본 발명에 따라 동애등에 유충을 전처리하는 공정에 관련된 상기 I) 단계 내지 II) 단계를 거친 후, 키틴을 추출하는 공정에 관련된 III) 단계 및 키틴을 키토산으로 전환하는 공정에 관련된 IV) 단계를 순차적으로 포함하는 동애등에 유래 키토산의 제조방법에 대하여 첨부된 도 1에 나타낸 각 단계별로 상세히 서술한다.

[47] **I) 동애등에 유충의 도살 단계**

[48] 본 발명에서는, 동애등에 유충을 살아있는 채로 마이크로웨이브에서 가열건조하면서 도살하는 것을 기술적 특징으로 한다.

[49] 종래에는 곤충의 유충을 도살하기 위해서 주로 탕침 또는 블렌칭을 수행하였다. 그러나 탕침 또는 블렌칭을 수행하는데는 기본적으로 대량의 물과 100°C 이상의 고온 및 별도의 건조과정이 필요하여 에너지 소모가 많고 경우에 따라서는 곤충의 갈변 현상이 나타날 우려가 있다.

[50] 따라서 본 발명에서는 동애등에 유충을 살아있는 채로 마이크로웨이브에서 가열건조하면서 도살하는 간단한 공정으로 에너지 소모를 줄이고 갈변 현상을 방지할 수 있었다.

[51] 이때, 상기 마이크로웨이브에서 가열건조 과정은 70~80°C로 0.5~1시간 동안 수행하는 것이 바람직한바, 상기 조건을 벗어날 경우에는 일부 유충이 완벽하게 도살되지 않거나 갈변 현상이 발생할 수 있다.

[52] **II) 분쇄 및 압착 단계**

[53] 상기 I) 단계에서 도살된 동애등에 유충을 분쇄 및 압착한다. 이러한 분쇄 및 압착 과정은 분쇄기를 사용하여 동애등에 유충의 입자를 150~200 μm 크기로 조절한 후, 이중 스크류 압착기로 압착하는 것을 특징으로 한다.

[54] 먼저, 도살된 동애등에 유충을 칼날 분쇄기를 사용하여 유충의 입자를 150~200 μm 크기로 조절하는데, 분쇄를 용이하게 하기 위하여 일정량의 물을 첨가한다. 동애등에 유충의 입자를 분쇄기를 사용하여 150 μm 미만의 크기로 기계적으로 제어하는 것은 어렵고, 그 크기가 200 μm 를 초과하는 경우에는 III) 단계의 키틴

추출공정으로부터 얻어지는 키틴의 순도가 떨어지고, IV) 단계의 키틴산 전환공정 시 상대적으로 표면적이 작아 반응성이 낮기 때문에 탈아세틸화도가 높지 않을 수 있다.

[55] 또한, 압착과정은 상기 분쇄된 습윤 상태의 유층 입자를 이중-스크류 압착기로 압착하여 수행함으로써 압착효율을 높여 유층에 함유된 오일 함량을 10 중량% 미만, 건조물 함량을 30~50 중량% 미만으로 조절된 압착 케이크를 얻을 수 있다.

[56] **III) 키틴 추출 단계**

[57] 상기 분쇄 및 압착된 동애등에 유층의 압착 케이크를 효소가수분해 함으로써 키틴 성분을 추출한다. 상기 압착 케이크를 물과 함께 효소가 포함된 반응기에 투입하여 pH 6.5~8.5 분위기 하에서 40~60°C로 4~8시간 동안 효소가수분해를 수행한다.

[58] 이때, 상기 효소가수분해 공정에 사용되는 효소는 단일 프로테아제(protease)일 수 있고, 또는 다양한 프로테아제의 혼합물일 수도 있다.

[59] 상기 프로테아제는 아미노펩티다제(aminopeptidase), 메탈로카르복시펩티다제(metallocooxypeptidase), 세린 엔도펩티다제(serine endopeptidase), 시스테인 엔도펩티다제(cysteine endopeptidase), 아스파르트산 엔도펩티다제(aspartic endopeptidase) 및 메탈로엔도펩티다제(metalloendopeptidase)로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 것이 바람직하다.

[60] 또한, 상기 효소가수분해 공정은 산성 매질 하에서 활성을 갖는 효소를 사용할 수도 있는바, 산성 매질로서는 인산, 효소로서는 펩신을 바람직하게 사용하며, pH 1.5~2.5의 산성 매질 하에서 35~40°C로 5~10시간 동안 수행한다.

[61] 한편, 상기 효소가수분해 대신에 미생물 발효 공정에 의해서도 동애등에 유층으로부터 키틴을 추출할 수 있다.

[62] 상기 미생물 발효 공정에 사용되는 미생물은 젖산 생성 미생물 및 프로테아제 생성 미생물의 혼합물일 수 있다. 상기 젖산 생성 미생물은 락토바실러스(Lactobacillus) 속 또는 사카로마이세스(Saccharomyces) 속 미생물인 것이 바람직하며, 상기 프로테아제 생성 미생물은 바실러스(Bacillus) 속, 슈도모나스(Pseudomonas) 속, 슈도알테로모나스(Pseudoalteromonas) 속, 스트렙토마이세스(Streptomyces) 속, 브레비박테리움(Brevibacterium) 속 또는 마이크로코커스(Micrococcus) 속 미생물인 것이 바람직하다.

[63] 상기 미생물 발효 공정은 30~40°C로 5~7일 동안 수행함으로써 동애등에 유층으로부터 키틴을 추출할 수 있다.

[64] **IV) 키틴을 키틴산으로 전환하는 단계**

[65] 상기 III) 단계로부터 추출된 키틴을 탈아세틸화함으로써 키틴산을 수득하는바, 상기 탈아세틸화 반응과정은 20~70 중량% 농도의 수산화나트륨 용액으로 60~100°C에서 4~24시간 동안 수행한다. 또한, 상기 탈아세틸화 반응과정의 온도 및 시간을 조절함으로써 수평균분자량 10만 이상의 고분자량

키토산 및 수평균분자량 1만 이하의 저분자량 키토산 등 다양한 분자량 범위를 갖는 키토산을 얻을 수 있다. 특히, 30~50 중량% 농도의 수산화나트륨 용액으로 80~100°C에서 8~16시간 동안 탈아세틸화 반응을 수행하면 수평균분자량이 1,000~5,000 범위를 갖게 됨으로써 수용성이 크게 향상되어 다양한 분야에 응용 가능한 소재로 사용할 수 있다.

[66] 상기 탈아세틸화 공정을 거쳐 수득한 키토산은 자연건조 또는 진공 오븐에서 건조하여 분말 형상의 키토산을 제조할 수 있다. 진공오븐에서 건조할 경우, 제한되는 것은 아니지만 바람직하게는 50~80°C의 진공 오븐에서 건조하여 목적물인 분말 형상의 키토산을 제조한다.

[67] 이하에서는 본 발명에 따른 동애등에 유래 키토산의 제조방법에 대한 실시예 및 비교예를 구체적으로 서술한다.

[68] <실시예 1>

[69] 동애등에 유충을 살아있는 채로 마이크로웨이브에서 70°C로 0.5시간 동안 가열건조하여 도살하였다. 상기 도살한 동애등에 유충을 물과 혼합하고 분쇄기를 사용하여 유충의 입자를 170 μm 크기로 조절한 후, 상기 분쇄된 습윤 상태의 유충 입자를 이중-스크류 압착기로 압착하여 압착 케이크를 얻었다. 상기 압착 케이크를 물과 함께 효소[파파인(papain): 시스테인 엔도펩티다제 계열]가 포함된 반응기에 투입하여 pH 8.0 분위기 하에서 40°C로 6시간 동안 효소가수분해를 수행하여 키틴을 추출하였다. 상기 추출된 키틴을 30 중량% 농도의 수산화나트륨 용액으로 100°C에서 10시간 동안 탈아세틸화함으로써 키토산을 수득하였고, 이를 자연건조 시켜 목적물인 분말 형상의 키토산을 제조하였다.

[70] <실시예 2>

[71] 효소가수분해 공정으로서 pH 2.0의 인산 용액 하에서 활성을 갖는 효소[펩신(pepsin)]를 사용하여 35°C로 6시간 동안 수행한 것을 제외하고는 실시예 1과 동일한 방법으로 키토산을 제조하였다.

[72] <실시예 3>

[73] 효소가수분해 공정 대신에, 실시예 1에 따른 압착 케이크를 락토바실러스 속 미생물 및 슈도모나스 속 미생물의 혼합물이 포함된 반응기에 투입하여 30°C로 7일 동안 미생물 발효 공정을 수행한 것을 제외하고는 실시예 1과 동일한 방법으로 키토산을 제조하였다.

[74] <비교예>

[75] 실시예 1에 따른 도살, 분쇄 및 압착 단계의 전처리 공정을 수행하지 않은 것을 제외하고는 실시예 1과 동일한 방법으로 키토산을 제조하였다.

[76] <실험예1> 본 발명의 키틴의 순도 및 탈아세틸화도 분석

[77] 하기 표 1에는 상기 실시예 1 내지 3 및 비교예로부터 제조된 키틴의 순도 및 탈아세틸화도를 나타내었다. 키틴의 순도는 중량 측정, 즉 불용 부분을 1.25 mol/L의 수산화나트륨 용액으로 90°C에서 1시간 동안 처리하기 전과 후에 불용

시료의 질량을 측정함으로써 계산하였다.

[78] 순도(%)=[(처리 후 불용 부분의 질량)/(처리 전 불용 부분의 질량)] x 100

[79] 또한, 키틴의 탈아세틸화도(%)는 수득한 키틴산의 원소분석(Elemental analysis) 결과, 산-염기 적정법 및 적외선 분광 분석법(FT-IR spectroscopy)을 병행하여 정량하였다.

[80] [표1]

샘플	순도(%)	탈아세틸화도(%)
실시예 1	90	95
실시예 2	92	98
실시예 3	85	90
비교예	70	80

[81] 상기 표 1에서 보는 바와 같이, 본 발명의 실시예 1 내지 3으로부터 추출된 키틴은 순도가 비교예로부터 추출된 키틴에 비하여 현저하게 높은 것을 확인할 수 있고, 아울러 탈아세틸화도가 크게 높아져 고품질의 키틴산을 제조할 수 있음을 알 수 있다.

[82] 특히, 실시예 2에서처럼 산성 매질 하에서 활성을 갖는 효소를 사용하여 효소가수분해 공정을 수행함으로써 추출되는 키틴은 그 순도 및 탈아세틸화도가 가장 높은 것으로 확인되었다.

[83] <실험예2> 본 발명의 키틴 및 키틴산의 XRD 분석

[84] 상기 실시예에서 제조된 키틴 및 키틴산 각각에 대해 XRD 분석을 진행하였고, 키틴의 XRD 분석 결과는 도 2에, 상기 키틴을 이용하여 제조된 키틴산의 XRD 분석 결과를 도 3에 나타내었다.

[85] 분석 결과, 본 발명에 따른 키틴(도 3의 빨간색 부분)이 거의 나타나 있지 않으므로 본 발명에 따른 고순도의 키틴이 키틴산으로 잘 전환되었음을 알 수 있다.

[86] 상기 실험예의 결과를 종합해보면 본 발명에 따라 제조된 키틴산은 바이오·제약, 식품, 농업, 사료 첨가제 등 다양한 산업분야에 응용이 가능한 소재로 기대된다.

[87] <실험예3> 본 발명의 키틴산의 NMR 분석

[88] 본 발명에 따라 추출된 키틴산의 구조적 특성을 분석하기 위해 NMR 분석을 하였고, 그 결과는 도 4에 도시하였다.

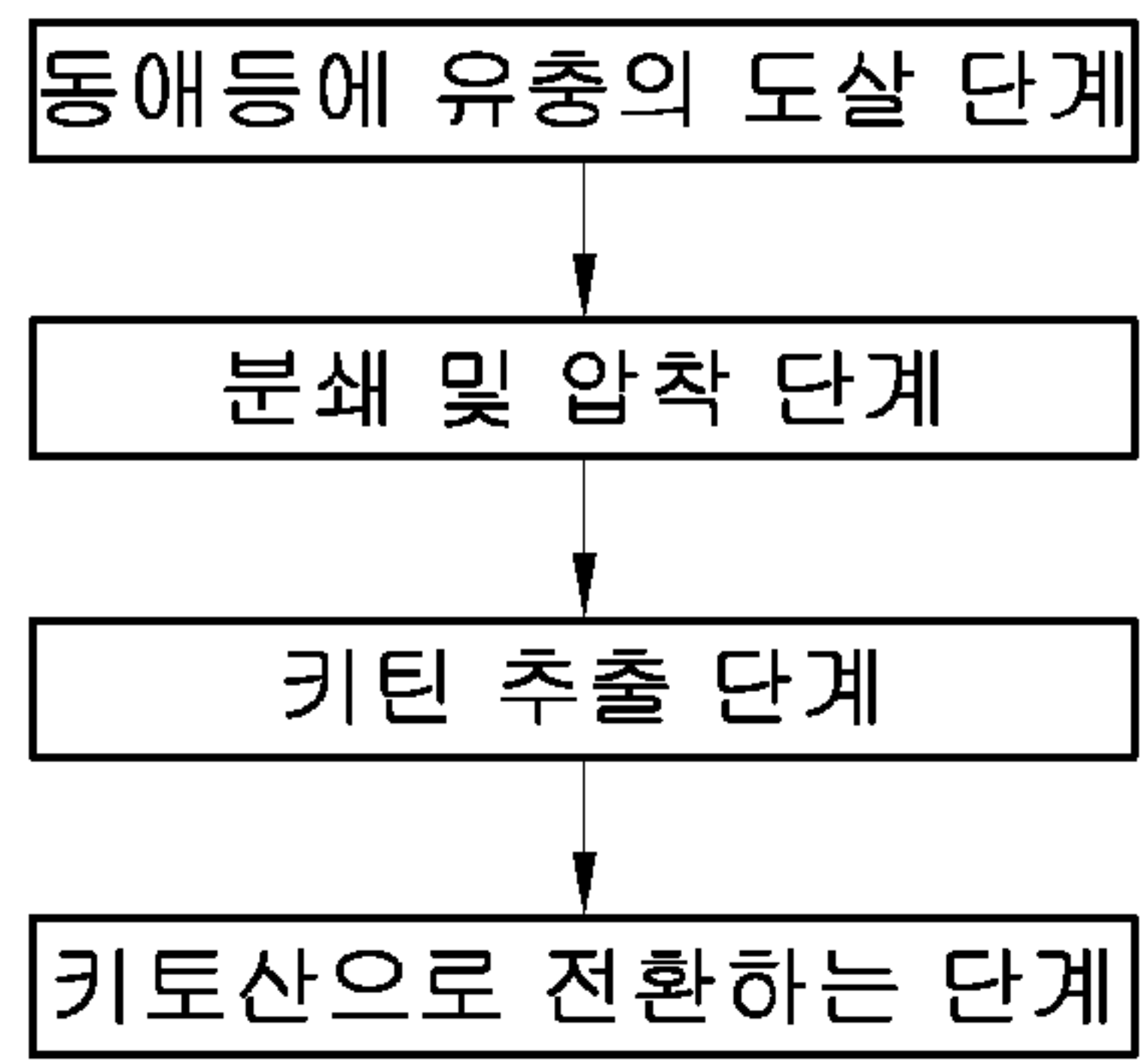
[89] 분석결과, 본 발명에 따른 키틴산은 α 구조를 갖는 것을 확인하였다.

청구범위

- [청구항 1] I) 동애등에 유충을 살아있는 채로 마이크로웨이브에서 가열건조하면서 도살하는 단계;
 II) 상기 도살된 동애등에 유충을 분쇄 및 압착하는 단계;
 III) 상기 분쇄 및 압착된 동애등에 유충으로부터 효소가수분해 또는 미생물 발효 공정에 의해서 키틴을 추출하는 단계; 및
 IV) 상기 추출된 키틴을 탈아세틸화하여 키토산을 수득하는 단계;
 를 포함하는 동애등에 유래 키토산의 제조방법.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 마이크로웨이브에서 가열건조 과정은 70~80°C로 0.5~1시간 동안 수행하는 것을 특징으로 하는 동애등에 유래 키토산의 제조방법.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 분쇄 및 압착 과정은 분쇄기를 사용하여 동애등에 유충의 입자를 150~200 μm 크기로 조절한 후, 이중 스크류 압착기로 압착하는 것을 특징으로 하는 동애등에 유래 키토산의 제조방법.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 효소가수분해 공정에 사용되는 효소는 단일 프로테아제 또는 프로테아제의 혼합물인 것을 특징으로 하는 동애등에 유래 키토산의 제조방법.
- [청구항 5] 제4항에 있어서, 상기 프로테아제는 아미노펩티다제, 메탈로카르복시펩티다제, 세린 엔도펩티다제, 시스테인 엔도펩티다제, 아스파르트산 엔도펩티다제 및 메탈로엔도펩티다제로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 것을 특징으로 하는 동애등에 유래 키토산의 제조방법.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 효소가수분해 공정은 pH 1.5~2.5의 산성 매질 하에서 35~40°C로 5~10시간 동안 수행하는 것을 특징으로 하는 동애등에 유래 키토산의 제조방법.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 미생물 발효 공정에 사용되는 미생물은 젖산 생성 미생물 및 프로테아제 생성 미생물의 혼합물인 것을 특징으로 하는 동애등에 유래 키토산의 제조방법.
- [청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 젖산 생성 미생물은 락토바실러스 속 또는 사카로마이세스 속 미생물인 것을 특징으로 하는 동애등에 유래 키토산의 제조방법.
- [청구항 9] 제7항에 있어서, 상기 프로테아제 생성 미생물은 바실러스 속, 슈도모나스 속, 슈도알테로모나스 속, 스트렙토마이세스 속, 브레비박테리움 속 또는 마이크로코커스 속 미생물인 것을 특징으로 하는 동애등에 유래 키토산의 제조방법.
- [청구항 10] 제1항에 있어서, 상기 미생물 발효 공정은 30~40°C로 5~7일 동안 수행하는 것을 특징으로 하는 동애등에 유래 키토산의 제조방법.

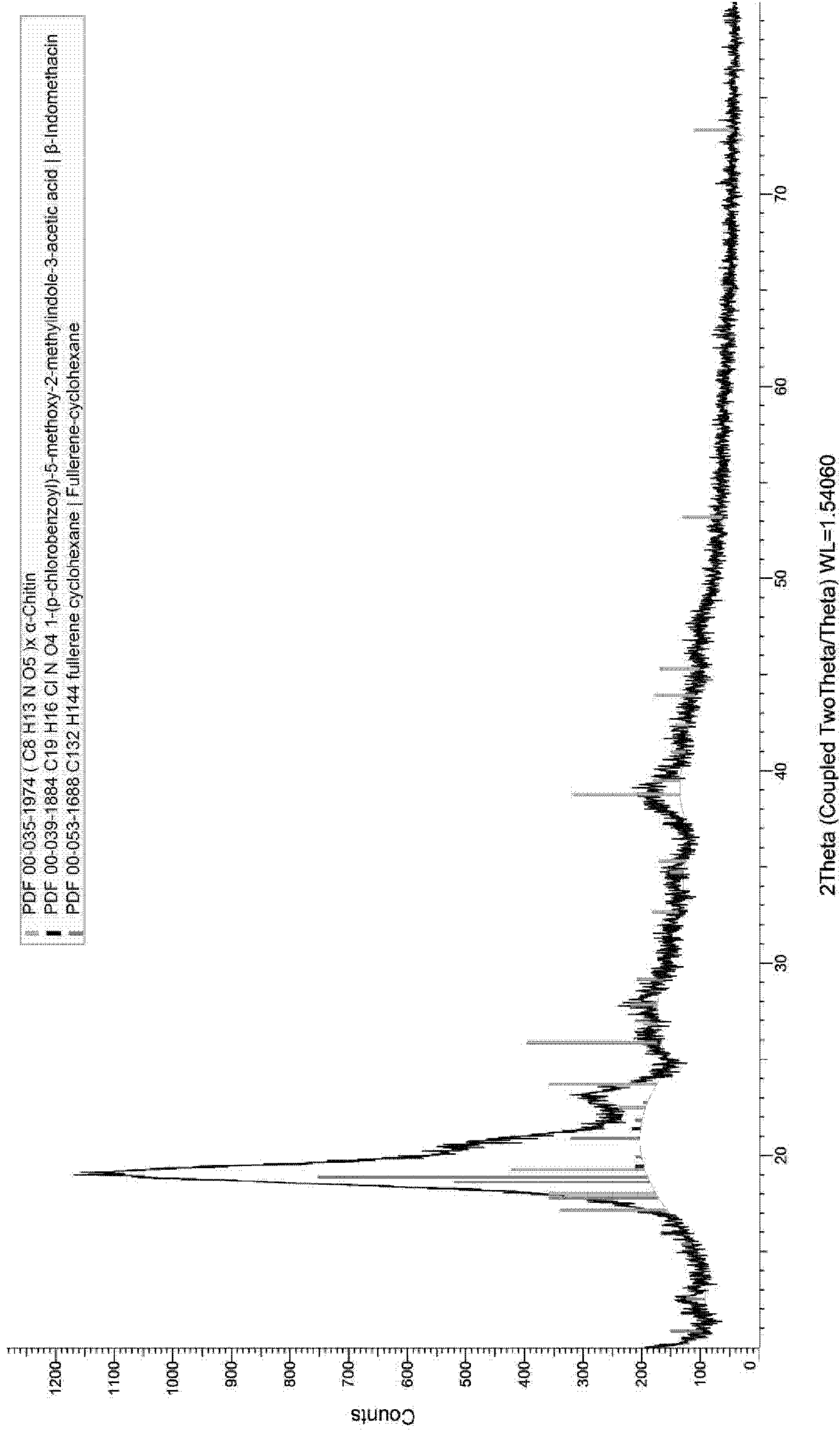
- [청구항 11] 제1항에 있어서, 상기 탈아세틸화 반응과정은 20~70 중량% 농도의 수산화나트륨 용액으로 60~100°C에서 4~24시간 동안 수행하는 것을 특징으로 하는 동애등에 유래 키틴산의 제조방법.
- [청구항 12] I) 동애등에 유충을 살아있는 채로 마이크로웨이브에서 가열건조하면서 도살하는 단계;
 II) 상기 도살된 동애등에 유충을 분쇄 및 압착하는 단계;
 III) 상기 분쇄 및 압착된 동애등에 유충으로부터 효소가수분해 또는 미생물 발효 공정에 의해서 키틴을 추출하는 단계; 및
 IV) 상기 추출된 키틴을 탈아세틸화하여 제조된 동애등에 유래 키틴산.
- [청구항 13] 제12항에 있어서, 상기 키틴산은 α 키틴산인 것을 특징으로 하는 키틴산.
- [청구항 14] I) 동애등에 유충을 살아있는 채로 마이크로웨이브에서 가열건조하면서 도살하는 단계;
 II) 상기 도살된 동애등에 유충을 분쇄 및 압착하는 단계;
 III) 상기 분쇄 및 압착된 동애등에 유충으로부터 효소가수분해 또는 미생물 발효 공정에 의해서 키틴을 추출하여 키틴을 수득하는 단계를 포함하는 동애등에 유래 키틴의 제조방법.
- [청구항 15] 동애등에 유충으로부터 효소가수분해 또는 미생물 발효 공정에 의해서 추출된 키틴.
- [청구항 16] 제15항에 있어서, 상기 키틴은 탈아세틸화도가 90% 이상인 것을 특징으로 하는 동애등에 유래 키틴.
- [청구항 17] 제15항에 있어서, 상기 키틴은 순도 85% 이상인 것을 특징으로 하는 동애등에 유래 키틴.

[도1]



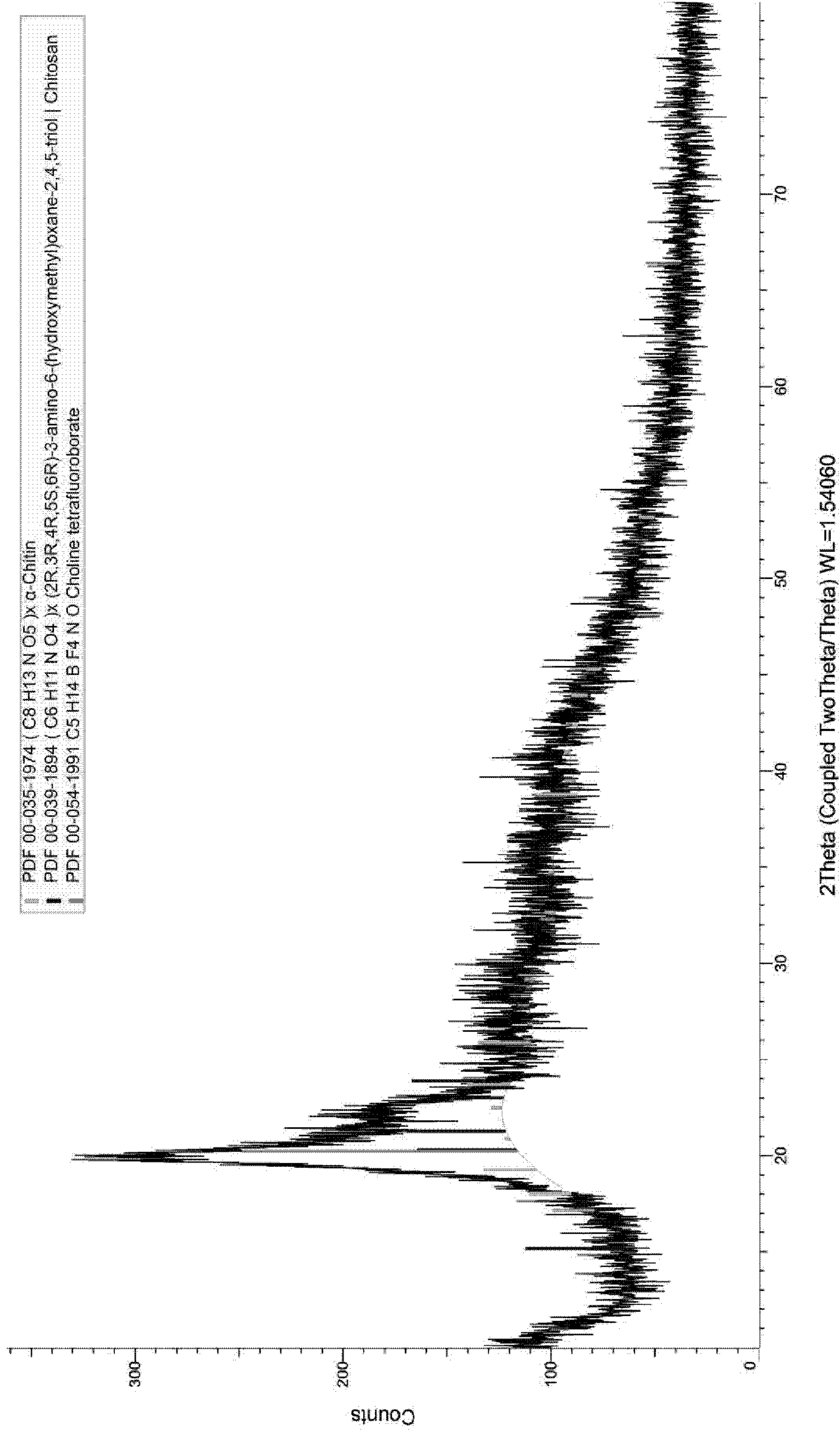
[도2]

(Coupled TwoTheta/Theta)



[E3]

(Coupled TwoTheta/Theta)



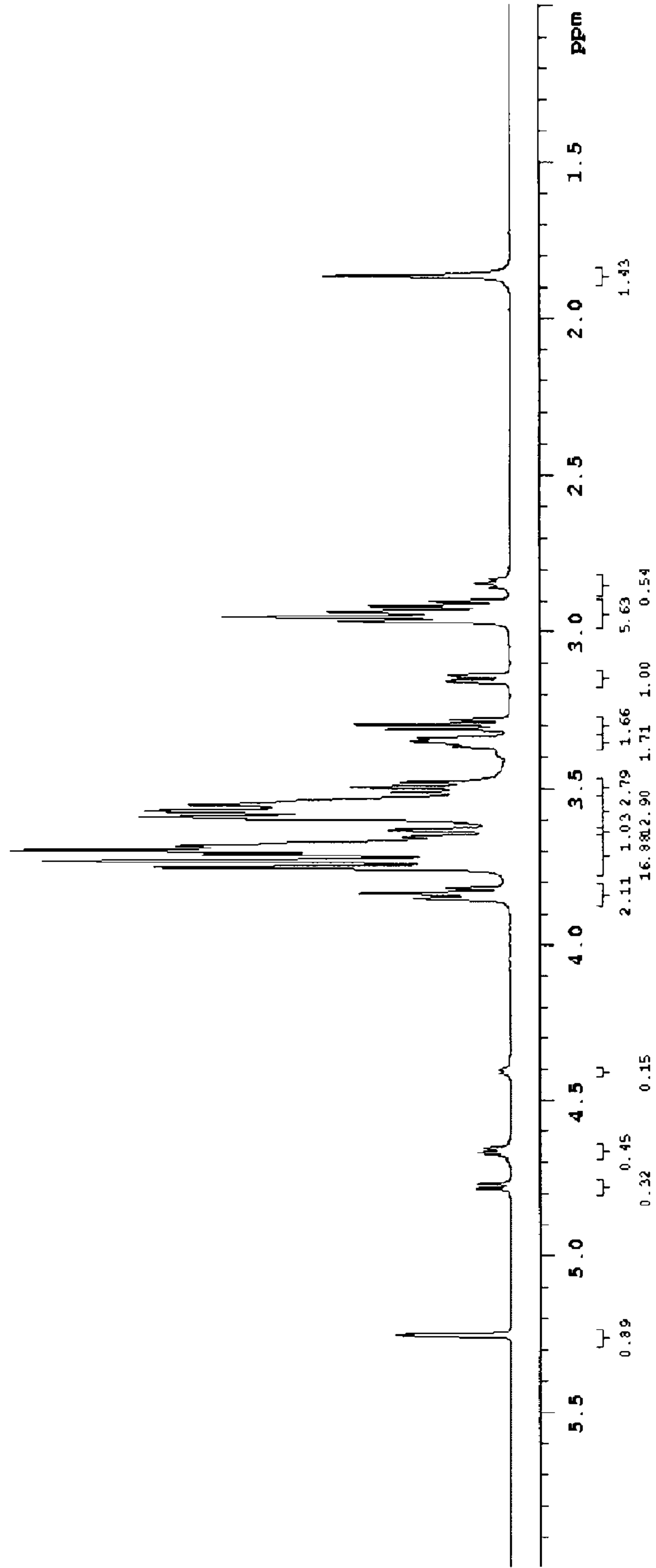
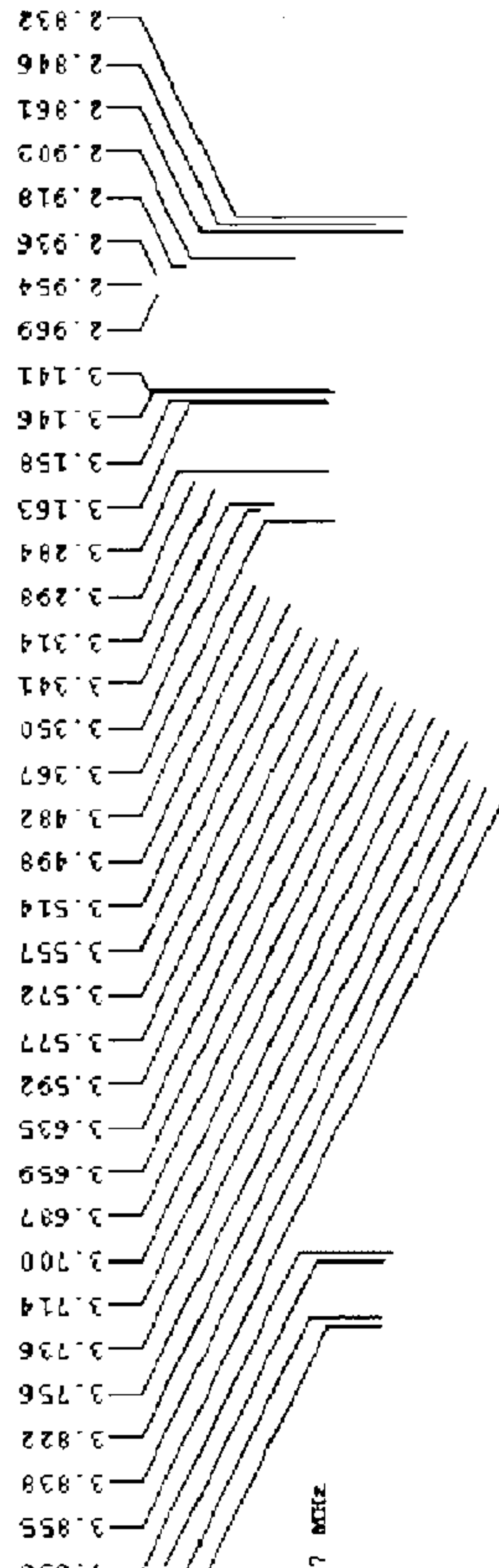
[도4]

¹H NMR 600 MHz, Alpha-chitosan

SC- α -Chitosan 600 MHz, ¹H NMR 1/3

1K_160303_achito

0.00
 0.00
 0.00
 Operator: ~~haha~~
 Relax. delay 2.000 sec
 Pulse 90.0 degrees
 Acq. time 1.704 sec
 Width 9615.4 Hz
 # repetitions
 OBSERVE K1, 599.9766747 MHz
 DATA PROCESSING
 FT size 32768
 Total time 0 min 37 sec



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/015019

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P 19/04(2006.01)i

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)

C12P 19/04; C07K 14/435; C08B 37/08; C12N 1/20; C12P 19/14; C12P 19/26; C12P 39/00

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: Plecticus tenebrifer, chitosan, chitin, microwave, enzymatic hydrolysis, microorganism fermentation

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2018-0002452 A1 (YNSECT) 04 January 2018 See paragraphs [0036], [0050]-[0054], [0159], [0176], [0177], [0257] and [0276]; table 1; claims 10-13; and figure 2.	15-17
Y		1-14
Y	CN 104878057 A (SHANXI AGRICULTURAL UNIVERSITY et al.) 02 September 2015 See abstract; and claim 1.	1-14
Y	US 2012-0315668 A1 (LPEZ-CERVANTES, J. et al.) 13 December 2012 See paragraphs [0052]-[0060]; and claims 2, 3, 9, 16-18 and 22.	7-10
A	US 2014-0100361 A1 (LE ROUX, K. et al.) 10 April 2014 See entire document.	1-17
A	김형규. 반려동물용 곤충간식...팻맘 잡고 2년새 매출 10억. 한국경제. 20 September 2019. non-official translation (KIM, Hyeonggyu. Insect Snack for Companion Animals...1 Billion Won in Sales in Two Years Appealing to Pet Owners. The Korea Economic Daily). <URL: https://www.hankyung.com/life/article/2019092037841 > See entire document.	1-17

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

“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

29 JULY 2020 (29.07.2020)

Date of mailing of the international search report

29 JULY 2020 (29.07.2020)

Name and mailing address of the ISA/KR



Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/015019

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2018-0002452 A1	04/01/2018	CA 2970718 A1	07/07/2016
		CN 107257860 A	17/10/2017
		CN 107257860 B	02/04/2019
		EP 3240903 A1	08/11/2017
		EP 3240903 B1	06/05/2020
		FR 3031114 A1	01/07/2016
		FR 3031114 B1	26/01/2018
		WO 2016-108034 A1	07/07/2016
CN 104878057 A	02/09/2015	None	
US 2012-0315668 A1	13/12/2012	AR 079582 A1	01/02/2012
		BR 112012015501 A2	25/08/2015
		CN 102665436 A	12/09/2012
		CN 102665436 B	06/05/2015
		EP 2515674 A1	31/10/2012
		EP 2515674 B1	09/03/2016
		EP 3075842 A1	05/10/2016
		ES 2572764 T3	02/06/2016
		MX 2012007293 A	30/11/2012
		TW 201137128 A	01/11/2011
		US 2011-0151508 A1	23/06/2011
		US 8748124 B2	10/06/2014
		UY 33146 A	29/07/2011
WO 2011-076759 A1	30/06/2011		
US 2014-0100361 A1	10/04/2014	EC SP13013114 A	31/05/2014
		EP 2714918 A1	09/04/2014
		FR 2975706 A1	30/11/2012
		FR 2975706 B1	21/07/2017
		JP 2014-522240 A	04/09/2014
		WO 2012-168618 A1	13/12/2012

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12P 19/04(2006.01)i
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12P 19/04; C07K 14/435; C08B 37/08; C12N 1/20; C12P 19/14; C12P 19/26; C12P 39/00 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: 동애등애(Ptecticus tenebrifer), (키토산(chitosan), 키틴(chitin)), 마이크로웨이브(microwave), 효소가수분해(enzymatic hydrolysis), 미생물발효(microorganism fermentation)

C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	US 2018-0002452 A1 (YNSECT) 2018.01.04 단락 [0036], [0050]-[0054], [0159], [0176], [0177], [0257], [0276]; 표 1; 청구항 10-13; 도면 2	15-17
Y		1-14
Y	CN 104878057 A (SHANXI AGRICULTURAL UNIVERSITY 등) 2015.09.02 요약; 청구항 1	1-14
Y	US 2012-0315668 A1 (LPEZ-CERVANTES, J. 등) 2012.12.13 단락 [0052]-[0060]; 청구항 2, 3, 9, 16-18, 22	7-10
A	US 2014-0100361 A1 (LE ROUX, K. 등) 2014.04.10 전체 문헌	1-17
A	김형규, “반려동물용 곤충간식...팻맘 잡고 2년새 매출 10억”, 한국경제, 2019.09.20 <URL: https://www.hankyung.com/life/article/2019092037841 > 전체 문헌	1-17

추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:	“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌
“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌	“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.
“D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌	“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.
“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌	“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 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	

국제조사의 실제 완료일 2020년 07월 29일 (29.07.2020)	국제조사보고서 발송일 2020년 07월 29일 (29.07.2020)
--	---

ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578	심사관 정다원 전화번호 +82-42-481-5373
--	------------------------------------



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2018-0002452 A1	2018/01/04	CA 2970718 A1	2016/07/07
		CN 107257860 A	2017/10/17
		CN 107257860 B	2019/04/02
		EP 3240903 A1	2017/11/08
		EP 3240903 B1	2020/05/06
		FR 3031114 A1	2016/07/01
		FR 3031114 B1	2018/01/26
		WO 2016-108034 A1	2016/07/07
CN 104878057 A	2015/09/02	없음	
US 2012-0315668 A1	2012/12/13	AR 079582 A1	2012/02/01
		BR 112012015501 A2	2015/08/25
		CN 102665436 A	2012/09/12
		CN 102665436 B	2015/05/06
		EP 2515674 A1	2012/10/31
		EP 2515674 B1	2016/03/09
		EP 3075842 A1	2016/10/05
		ES 2572764 T3	2016/06/02
		MX 2012007293 A	2012/11/30
		TW 201137128 A	2011/11/01
		US 2011-0151508 A1	2011/06/23
		US 8748124 B2	2014/06/10
		UY 33146 A	2011/07/29
WO 2011-076759 A1	2011/06/30		
US 2014-0100361 A1	2014/04/10	EC SP13013114 A	2014/05/31
		EP 2714918 A1	2014/04/09
		FR 2975706 A1	2012/11/30
		FR 2975706 B1	2017/07/21
		JP 2014-522240 A	2014/09/04
		WO 2012-168618 A1	2012/12/13