



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0026161
(43) 공개일자 2011년03월15일

(51) Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01) C12R 1/07 (2006.01)
C12R 1/225 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0083940

(22) 출원일자 2009년09월07일

심사청구일자 2009년09월07일

(71) 출원인

인하대학교 산학협력단

인천 남구 용현동 253 인하대학교

(72) 발명자

윤현식

인천광역시 남구 용현3동 인하대학교 생명화학공
학부

김영범

인천광역시 계양구 작전동 도두리 동남아파트
518-2003

유덕상

인천광역시 서구 석남1동 482-26번지 28통 4반

(74) 대리인

양부현

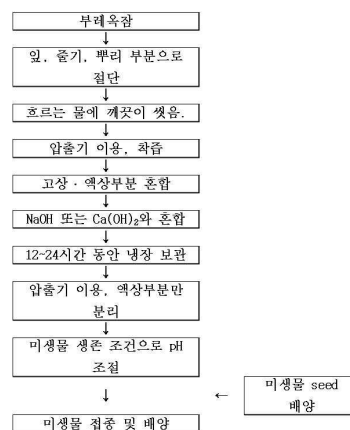
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 부레옥잠 추출물을 주성분으로 포함하는 미생물 배양배지

(57) 요약

본 발명은 부레옥잠 추출물을 주성분으로 포함하는 미생물 배양배지 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명은 환경 생태계에 영향을 주는 부레옥잠을 처리하는 방법 중의 하나로써, 부레옥잠을 전 처리하여 미생물 배양배지를 제조하여, 산업적으로 많이 사용되는 미생물의 생장에 유용하다는 점을 보여줌으로써 산업적으로 사용되는 미생물 배지 가격 절감에 기여할 수 있다. 본 발명의 부레옥잠 배지는 다양한 미생물에 대하여 우수한 배양배지 역할을 하며, 재조합 미생물에 대하여도 종래의 배지와 거의 동일한 성장 상태를 나타내어, 재조합 기술에서의 미생물 배양에도 적합하고, 형질전환 되어 들어간 플라스미드의 안정성을 유지시킬 수 있다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

부레옥잠 추출물을 주성분으로 포함하는 미생물 배양배지.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 미생물은 바실러스(*Bacillus*)속, 대장균, 효모(yeast)속, 스트렙토마이세스(*Streptomyces*)속, 락토바실러스(*Lactobacillus*)속, 슈도모나스(*Pseudomonas*)속 및 재조합 미생물로 구성된 군 으로부터 선택되는 미생물인 것을 특징으로 하는 미생물 배양배지.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 바실러스(*Bacillus*)속 미생물은 바실러스 리체니포르미스(*Bacillus licheniformis*), 바실러스 코아굴런스(*Bacillus coagulans*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) 및 바실러스 메가테리움(*Bacillus megaterium*)으로 구성된 군 으로부터 선택되는 미생물인 것을 특징으로 하는 미생물 배양배지.

청구항 4

제 2 항에 있어서, 상기 대장균속 미생물은 *E. coli*(*Escherichia coli*)인 것을 특징으로 하는 미생물 배양배지.

청구항 5

제 2 항에 있어서, 상기 효모(yeast)속 미생물은 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*) 또는 스타메렐라 봄비콜라(*Starmerella bombicola*)인 것을 특징으로 하는 미생물 배양배지.

청구항 6

제 2 항에 있어서, 상기 스트렙토마이세스(*Streptomyces*)속 미생물은 스트렙토마이세스 코엘리컬러(*Streptomyces coelicolor*)인 것을 특징으로 하는 미생물 배양배지.

청구항 7

제 2 항에 있어서, 상기 락토바실러스(*Lactobacillus*)속 미생물은 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) 또는 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*)인 것을 특징으로 하는 미생물 배양배지.

청구항 8

제 2 항에 있어서, 상기 슈도모나스(*Pseudomonas*)속 미생물은 슈도모나스 퓨티다(*Pseudomonas putida*)인 것을 특징으로 하는 미생물 배양배지.

청구항 9

부레옥잠으로부터 추출물을 수득하는 단계를 포함하는 미생물 배양배지의 제조방법.

청구항 10

제 1 항에 있어서, 상기 부레옥잠으로부터 추출물을 수득하는 것은 압출기에 부레옥잠을 적용하여 실시되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제 10 항에 있어서, 상기 방법은 다음의 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:

- (a) 압출기에 부레옥잠을 적용하여 액상의 추출액 및 고상의 잔사를 수득하는 단계; 및
- (b) 상기 액상의 추출액 및 고상의 잔사를 혼합한 다음 산 또는 알칼리 처리하여 조직을 연질화 시키고 부레옥잠의 성분들을 추출하는 단계.

청구항 12

제 11 항에 있어서, 상기 방법은 단계 (b) 이후에 단계 (b)의 결과물을 압출기에 다시 적용하여 액상의 추출액을 수득하는 단계 (c)를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제 12 항에 있어서, 상기 방법은 단계 (b) 및 단계 (c) 사이에 단계 (b)의 결과물을 냉장보관 하는 단계를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제 11 항 또는 제 12 항에 있어서, 상기 방법은 단계 (b)의 결과물 또는 단계 (c)의 결과물을 미생물 배지로 사용하기 전에 pH를 조절하는 단계를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제 11 항에 있어서, 상기 단계 (b)에 사용되는 물질은 알칼리 물질인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

제 15 항에 있어서, 상기 알칼리 물질은 수산화칼슘 또는 수산화나트륨인 것을 특징으로 하는 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 부레옥잠 추출물을 주성분으로 포함하는 미생물 배양배지 및 그의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 부레옥잠은 수생식물로서 열대지역에서 서식하는 잡초의 일종이다. 수질정화를 할 수 있다는 장점이 있으나, 과량의 산소 및 영양분 소비로 인한 빠른 성장은 주변 생태계를 파괴하고 있다. 또한, 말라리아, 주혈흡충병

(bilharziasis) 및 사상충증(river blindness) 등과 같은 전염병을 일으킬 수 있는 미생물체의 서식지를 제공하기도 해서 위생적으로도 많은 문제점이 있다.

[0003] 한편, 부레옥잠에는 조단백질, 조섬유질, 질소원 및 탄소원 등 여러 영양염류들이 함유되어 있는 것으로 알려져 있다. 최근에는 부레옥잠의 수질정화로의 이용 이외에 바이오에너지 생산을 위한 바이오매스 피드스톡(biomass feedstock), 동물용 사료 및 사료첨가제, 펠름 및 비료, 퇴비로의 이용 등으로 그 처리방법을 다양화하고 있는 실정이다.

[0004] 한편, 바실러스(*Bacillus*)속 미생물은 토양의 단립화를 촉진, 공기의 유통, 보수력을 좋게 하고, 근권을 양호하게 하여 수세(樹勢)를 회복시켜 식물의 면역을 촉진한다. 바실러스는 우수한 인산 분해 능력을 갖고, 생산량 증대, 생산물의 맛을 좋게 하며, 화훼류는 깨끗한 꽃을 피우도록 한다. 또한 바실러스는 토양 중 유해미생물의 증식을 억제하고, 특히 사상균 발육저해효과가 크며, 곰팡이의 증식을 억제한다. 바실러스는 퇴비 만들기에도 사용할 수 있으며, 안전하기 때문에 자연환경을 고려한 토양개량제로도 활용할 수 있는 이점이 있다.

[0005] 대장균은 해롭지 않은 변종의 경우, 대장의 공생생물이며 비타민 K₂ 등을 생산하여 이로움을 주기도 하며, 창자에서 병의 원인이 되는 박테리아의 번식을 막기도 한다. 대장균은 쉽게 번식하고 유전적으로 비교적 단순하고 다루기가 쉬워 가장 많이 연구된 원핵생물의 표본생물이고, 바이오테크놀로지에서도 중요하게 쓰이는 미생물이다.

[0006] 또한, 효모(yeast)속 미생물은 당을 발효시켜 에탄올과 이산화탄소를 생산하는 능력을 가진 것이 많아 맥주의 제조나 빵의 발효에 이용되고 있으며, 효모 자체는 값싼 지방, 단백질을 원료로 사료에 사용된다. 비타민 B군을 풍부하게 함유하고, 비타민 D를 함유하는 것도 있다. 최근에는 의약품 공업에도 많이 쓰이는 균주이다.

[0007] 락토바실러스(*Lactobacillus*)속 미생물은 산업적으로 유제품, 맥주, 와인, 김치 등의 생산에 사용되고 있으며, 동물사료로도 쓰이고 있다. 슈도모나스(*Pseudomonas*)속 미생물은 지방족 탄화수소, 페놀류, 테르펜 및 스테로이드 등 광범위한 유기물을 분해 및 이용할 수 있으며 균체 끝부분에 편모가 있는 간상세균으로서 근권 정착율이 높은 편이다. 슈도모나스는 용균효소(chitinase) 분비로 병원균 세포벽을 용해하고, 항생물질(예: pyrrolnitrin, pyoluteorin 및 phenazines) 분비로 병원균을 억제할 수 있다. 또한, 슈도모나스는 채소류의 묘잘룩 병이나 시들음 병 등을 억제하기도 하며 사상균에 높은 활성을 나타낸다.

[0008] 스트렙토마이세스(*Streptomyces*)속 미생물은 토양 방선균의 대표적인 속으로 항생물질을 생산하는 점이 가장 특징적이다. 의약품 및 농약용의 항생물질을 생산하는데 많이 이용되며, 공업적으로도 생산되기도 한다.

[0009] 위와 같은 미생물을 배양하기 위하여 탄소원, 질소원 및 여러 영양물질들이 포함된 배지를 사용하고 있다. 미생물 배양을 위한 당업계의 통상적인 배지의 조성 및 배양조건은 하기 표 1과 같다.

표 1

균주	배지 조성	배양조건
바실러스(<i>Bacillus</i>)속 미생물	LB 배지 (배지 1리터 당) 트립톤 10.0g, 염화나트륨 5.0g, 효모 추출물 5.0g	진탕배양 30℃, pH 7.0
	TSB 배지 (배지 1리터 당) 트립톤 15.0g, 소이톤 5.0g, 염화나트륨 5.0g	진탕배양 30℃, pH 7.0
대장균(<i>Escherichia coli</i>)	LB 배지 (배지 1리터 당) 트립톤 10.0g, 염화나트륨 5.0g, 효모 추출물 5.0g	진탕배양 37℃, pH 7.0
	YM 배지 (배지 1리터 당) 효모 추출물 3.0g, 말트 추출물 3.0g, 펩톤 5.0g, 글루코오스 10.0g	진탕배양 30℃, pH 7.0
락토바실러스(<i>Lactobacillus</i>)속 미생물	MRS 배지 (배지 1리터 당) 글루코오스 20g, 프로테오스 펩톤 10g, 비프 추출물 10g, 효모 추출물 5g, 트윈 80 1g, 암모늄 시트레이트 2.0g, 소디움 아세테이트 5.0g, 디포타슘 포스페이트 2g, 마그네슘 설페이트 0.1g, 망간네이즈 설페이트 0.05g	정지배양 37℃, pH 7.0
	LB 배지 (배지 1리터 당) 트립톤 10.0g, 염화나트륨 5.0g, 효모 추출물 5.0g	진탕배양 30℃, pH 7.0
슈도모나스(<i>Pseudomonas</i>)속 미생물	GG1 배지 (배지 1리터 당) 글루코오스 15g, 글리세롤 15g, 소이 펩톤 15g, 염화나트륨 3g, 탄산칼슘 1g	진탕배양 30℃, pH 7.0

[0010]

[0011] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0012] 본 발명자들은 가능한 저가의 경제적인 배지를 개발하되, 다양한 미생물에서 우수한 성장 상태(최소한 기존의 배지와 비슷한 수준의 성장 상태)를 보여 줄 수 있는 범용성의 배지를 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 부레옥잠의 추출물이 위와 같은 장점을 발휘할 수 있는 배지로 개발될 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0013] 본 발명의 목적은 미생물 배양배지를 제공하는 데 있다.

[0014] 본 발명의 다른 목적은 미생물 배양배지를 제조하는 방법을 제공하는 데 있다.

[0015] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제 해결수단

[0016] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 부레옥잠 추출물을 주성분으로 포함하는 미생물 배양배지를 제공한다.

[0017] 본 발명자들은 가능한 저가의 경제적인 배지를 개발하되, 다양한 미생물에서 우수한 성장 상태(최소한 기존의 배지와 비슷한 수준의 성장 상태)를 보여 줄 수 있는 범용성의 배지를 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 부레옥잠의 추출물이 위와 같은 장점을 발휘할 수 있는 배지로 개발될 수 있음을 확인하였다.

[0018] 본 발명의 배지는 부레옥잠 추출물을 주성분으로 포함한다.

[0019] 본 명세서에서 용어 “부레옥잠 추출물”은 부레옥잠의 다양한 기관(잎, 줄기 및 뿌리)로부터 추출하여 얻은 것을 의미한다. 용어 “부레옥잠 추출물”은 본 명세서에서 부레옥잠 추출액 및 부레옥잠 원액 등의 용어와 혼용된다. 하기의 실시예에서는 부레옥잠의 잎, 줄기 및 뿌리 모두를 이용하여 부레옥잠 추출물을 얻는다.

[0020] 부레옥잠 추출물은 당업계에 공지된 통상적인 방법으로 얻을 수 있다. 예를 들어, 기계적인 방법으로서 압출기에 부레옥잠을 적용하여 부레옥잠 추출물을 얻을 수 있다.

[0021] 또한, 부레옥잠 추출물은 추출용매를 사용하여 얻을 수도 있다. 예를 들어, (a) 물, (b) 탄소수 1-4의 무수 또는 함수 저급 알코올 (예: 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올, 노말-프로판올, 이소-프로판올 및 노말-부탄올 등), (c) 상기 저급 알코올과 물과의 혼합용매, (d) 아세톤, (e) 에틸 아세테이트, (f) 클로로포름, (g) 1,3-부틸렌글리콜, (h) 헥산, (i) 디에틸에테르, 또는 (j) 부틸아세테이트를 부레옥잠에 적용하여 부레옥잠 추출물을 얻을 수 있다.

[0022] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 부레옥잠 추출물은 압출기에 부레옥잠을 적용하여 얻는다. 부레옥잠 추출물을 추출용매를 이용하여 얻는 경우에는, 부레옥잠 추출물에 포함되어 미생물의 배양에 이용되는 성분, 예컨대 탄소원, 질소원, 미량원소 등이 파괴되는 문제점이 있다.

[0023] 본 발명의 부레옥잠 추출물은 상술한 방법을 통하여 얻은 것뿐만 아니라, 여기에 정제과정을 추가적으로 적용하여 얻은 것도 포함한다. 예컨대, 상기 추출물을 일정한 분자량 컷-오프 값을 갖는 한외 여과막을 통과시켜 얻은 분획, 다양한 크로마토그래피 (크기, 전하, 소수성 또는 친화성에 따른 분리를 위해 제작된 것)에 의한 분리 등, 추가적으로 실시된 다양한 정제 방법을 통해 얻어진 분획도 본 발명의 부레옥잠 추출물에 포함된다.

[0024] 본 발명의 부레옥잠 추출물은 감압 증류 및 동결 건조 또는 분무 건조 등과 같은 추가적인 과정에 의해 분말 상태로 제조될 수 있다. 이 경우, 분말 상태로 된 부레옥잠 추출물은 사용 전에 물 또는 적합한 완충용액에 용해시켜 미생물 배지로서 사용될 수 있다.

[0025] 본 명세서에서 부레옥잠을 언급하면서 사용되는 용어 “주성분”은 부레옥잠이 미생물 배지에서 에너지원, 탄소원 및 질소원으로 이용되는 것을 의미한다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 배지에는 부레옥

잠 추출물 이외에 다른 에너지원, 탄소원 및 질소원을 포함하지 않는다. 이러한 측면에서, 본 발명은 “부레옥잠 추출물을 포함하는 미생물 배양배지용 에너지원, 탄소원 또는 질소원 조성물”로 표현될 수 있다.

- [0026] 본 발명의 배지는 부레옥잠 추출물을 그대로 이용하거나 또는 부레옥잠 추출물에 추가적으로 물 또는 완충액을 첨가하여 이용할 수 있다.
- [0027] 본 발명의 배지는 다양한 미생물의 배양에 이용될 수 있다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 배지에 의해 배양될 수 있는 미생물은 원핵생물 및 효모이고, 보다 바람직하게는 바실러스(*Bacillus*)속, 대장균, 효모(yeast)속, 스트렙토마이세스(*Streptomyces*)속, 락토바실러스(*Lactobacillus*)속, 슈도모나스(*Pseudomonas*)속 및 재조합 미생물(바람직하게는, 재조합 원핵생물, 보다 바람직하게는 재조합 대장균)이다.
- [0028] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 배지에 의해 배양될 수 있는 바실러스(*Bacillus*)속 미생물은 바실러스 알베이(*B. alvei*), 바실러스 아밀로리퀴페이션스(*B. amyloliquefaciens*), 바실러스 안트라시스(*B. anthracis*), 바실러스 시리우스(*B. cereus*), 바실러스 서큘란스(*B. circulans*), 바실러스 글로비가이(*B. globigii*), 바실러스 인페르누스(*B. infernus*), 바실러스 라베(*B. larvae*), 바실러스 라테로스포르투스(*B. laterosporus*), 바실러스 무실라기노시스(*B. mucilaginosus*), 바실러스 나토(*B. natto*), 바실러스 폴리믹사(*B. polymyxa*), 바실러스 슈도안트라시스(*B. pseudoanthracis*), 바실러스 푸미러스(*B. pumilus*), 바실러스 스페리쿠스(*B. sphaericus*), 바실러스 스포로써모두란스(*B. sporothermodurans*), 바실러스 스테아로써모필러스(*B. stearothermophilus*), 바실러스 튜링겐시스(*B. thuringiensis*), 바실러스 리체니포르미스(*B. licheniformis*), 바실러스 코아굴런스(*B. coagulans*), 바실러스 서브틸리스(*B. subtilis*) 및 바실러스 메가테리움(*B. megaterium*)을 포함하며, 보다 바람직하게는 바실러스 리체니포르미스(*B. licheniformis*), 바실러스 코아굴런스(*B. coagulans*), 바실러스 서브틸리스(*B. subtilis*) 및 바실러스 메가테리움(*B. megaterium*)을 포함한다.
- [0029] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 배지에 의해 배양될 수 있는 대장균속 미생물은 *E. coli*(*Escherichia coli*)이다.
- [0030] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 배지에 의해 배양될 수 있는 효모(yeast)속 미생물은 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*) 또는 스타메렐라 봄비콜라(*Starmerella bombicola*)을 포함한다.
- [0031] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 배지에 의해 배양될 수 있는 스트렙토마이세스(*Streptomyces*)속 미생물은 스트렙토마이세스 아크로모게네스(*S. achromogenes*), 스트렙토마이세스 암보페이션스(*S. ambofaciens*), 스트렙토마이세스 오레오페이션스(*S. aureofaciens*), 스트렙토마이세스 아베르미틸리스(*S. avermitilis*), 스트렙토마이세스 클라블리게루스(*S. clavuligerus*), 스트렙토마이세스 펠레우스(*S. felleus*), 스트렙토마이세스 페라리티스(*S. ferralitis*), 스트렙토마이세스 필라멘토서스(*S. filamentosus*), 스트렙토마이세스 그리세우스(*S. griseus*), 스트렙토마이세스 하이그로스코피쿠스(*S. hygroscopicus*), 스트렙토마이세스 이위소슈퍼피쿠스(*S. iysosuperficus*), 스트렙토마이세스 리비단스(*S. lividans*), 스트렙토마이세스 노우르세이(*S. noursei*), 스트렙토마이세스 스카비에스(*S. scabies*), 스트렙토마이세스 소마리엔시스(*S. somaliensis*), 스트렙토마이세스 써모비오라세우스(*S. thermoviolaceus*), 스트렙토마이세스 톡시트리시나이(*S. toxytricini*), 스트렙토마이세스 츠쿠벤시스(*S. tsukubaensis*), 스트렙토마이세스 베네주엘라(*S. venezuelae*), 스트렙토마이세스 비올라세오루버(*S. violaceoruber*) 및 스트렙토마이세스 코엘리컬러(*S. coelicolor*)를 포함하며, 보다 바람직하게는 스트렙토마이세스 코엘리컬러(*S. coelicolor*)를 포함한다.
- [0032] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 배지에 의해 배양될 수 있는 락토바실러스(*Lactobacillus*)속 미생물은 락토바실러스 액시도필러스(*L. acidophilus*), 락토바실러스 브레비스(*L. brevis*), 락토바실러스 카제이(*L. casei*), 락토바실러스 코리니포미스(*L. coryniformis*), 락토바실러스 페멘툼(*L. fermentum*), 락토바실러스 김치아이(*L. kimchii*), 락토바실러스 무리너스(*L. murinus*), 락토바실러스 파라브레비스(*L. parabrevis*), 락토바실러스 파라플란타럼(*L. paraplantarum*), 락토바실러스 류테리(*L. reuteri*), 락토바실러스 사케이(*L. sakei*), 락토바실러스 살리바리우스(*L. salivarius*), 락토바실러스 플란타럼(*L. plantarum*) 및 락토바실러스 파라카제이(*L. paracasei*)를 포함하며, 보다 바람직하게는 락토바실러스 플란타럼(*L. plantarum*) 및 락토바실러스 파라카제이(*L. paracasei*)를 포함한다.
- [0033] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 배지에 의해 배양될 수 있는 슈도모나스(*Pseudomonas*)속 미생물은 슈도모나스 에루지노사(*P. aeruginosa*), 슈도모나스 클로로라피스(*P. chlororaphis*), 슈도모나스 플루오리센스(*P. fluorescens*), 슈도모나스 퍼투시노제나(*P. pertucinogena*), 슈도모나스 스투트제리(*P. stutzeri*), 슈도모나스 시린게(*P. syringae*) 및 슈도모나스 푸티다(*P. putida*)를 포함하며, 보다 바람직하게는 슈도모나스 푸

티다(*P. putida*)를 포함한다.

- [0034] 본 명세서에서 용어 “재조합 미생물”은 외래 유전자가 형질전환 되어 들어간 미생물을 의미한다.
- [0035] 하기의 실시예에서 입증한 바와 같이, 본 발명의 부레옥잠 배지는 다양한 미생물, 대표적으로 바실러스 속 미생물, 대장균 미생물, 효모속 미생물, 스트렙토마이세스속 미생물, 락토바실러스속 미생물 및 슈도모나스속 미생물 모두에 대하여 우수한 배지 역할을 한다. 특히, 미생물의 속에 따라 종래의 배지 조성이 서로 상이하다는 점을 고려하면, 부레옥잠 단일 조성의 배지로서 모든 속의 미생물에 대하여 우수한 생장 상태를 나타내는 것은 매우 놀라운 것이다.
- [0036] 또한, 본 발명의 부레옥잠 배지는 재조합 미생물에 대하여도 종래의 배지와 거의 동일한 생장 상태를 나타내어, 재조합 기술에서의 미생물 배양에도 적합하고, 형질전환 되어 들어간 플라스미드의 안정성을 유지시킬 수 있다.
- [0037] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 부레옥잠으로부터 추출물을 수득하는 단계를 포함하는 미생물 배양배지의 제조방법을 제공한다.
- [0038] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 부레옥잠으로부터 추출물을 수득하는 것은 압출기에 부레옥잠을 적용하여 실시된다.
- [0039] 압출기를 이용하여 부레옥잠 추출물을 제조하는 경우, 바람직하게는, 본 발명의 방법은 (a) 압출기에 부레옥잠을 적용하여 액상의 추출액 및 고상의 잔사를 수득하는 단계; 및 (b) 상기 액상의 추출액 및 고상의 잔사를 혼합한 다음 산 또는 알칼리 처리하여 조직을 연질화 시키고 부레옥잠의 성분들을 추출하는 단계를 포함한다.
- [0040] 본 발명에 이용되는 산 또는 알칼리는 당업계에서 통상적으로 알려진 어떠한 것도 포함한다. 바람직하게는, 본 발명에 이용되는 산은 황산, 염산, 과염소산, 옥화수소산, 브롬화수소산 및 질산과 같은 강산, 아세트산, 시트르산, 붕산 및 인산을 포함하며, 가장 바람직하게는 황산 및 염산이다.
- [0041] 본 발명에 이용되는 바람직한 알칼리는, 수산화나트륨, 수산화칼슘, 수산화칼륨, 수산화바륨, 수산화세슘, 수산화스트론튬, 수산화리튬, 수산화루비듐 및 수산화마그네슘과 같은 강알칼리, 암모니아 및 피리딘과 같은 약알칼리를 포함하며, 가장 바람직하게는 수산화나트륨 및 수산화칼슘이다.
- [0042] 산 또는 알칼리의 사용량은 바람직하게는 부레옥잠에 대하여 0.05-10 wt%, 보다 바람직하게는 0.05-5 wt%, 가장 바람직하게는 0.1-1 wt%이다.
- [0043] 산 또는 알칼리 처리에 의해, 부레옥잠의 조직이 연질화 되며 부레옥잠의 성분들(에너지원, 탄소원 및 질소원으로서의 단백질 및 당 성분들)이 추출되며 이에 의해 미생물 배지의 에너지원, 탄소원 및 질소원이 공급된다.
- [0044] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 단계 (b) 이후에 단계 (b)의 결과물을 압출기에 다시 적용하여 액상의 추출액을 수득하는 단계 (c)를 추가적으로 포함하며, 이 액상의 추출액을 미생물 배지로 이용한다.
- [0045] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 단계 (b) 및 단계 (c) 사이에 단계 (b)의 결과물을 냉장보관(바람직하게는 1-10℃, 보다 바람직하게는 2-8℃, 가장 바람직하게는 4℃) 하는 단계를 추가적으로 포함한다.
- [0046] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 단계 (b)의 결과물 또는 단계 (c)의 결과물을 미생물 배지로 사용하기 전에 pH를 조절하는 단계를 추가적으로 포함한다. 미생물 종마다 생장에 적합한 최적 pH(optimum pH) 값을 가지고 있다. pH 조절은 산 또는 알칼리 물질을 이용하여 조절할 수 있다.
- [0047] 본 발명에 따르면, 매우 간단한 공정을 통하여 우수한 미생물 생장력 및 기존 미생물 배지 대체 배지를 매우 경제적으로 얻을 수 있다.

효 과

- [0048] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0049] (a) 본 발명의 배지는 부레옥잠 추출물을 주성분으로 포함한다.
- [0050] (b) 본 발명은 환경 생태계에 영향을 주는 부레옥잠을 처리하는 방법 중의 하나로써, 부레옥잠을 전 처리하여 미생물 배양배지를 제조하여, 산업적으로 많이 사용되는 미생물의 생장에 유용하다는 점을 보여줌으로써 산업적

으로 사용되는 미생물 배지 가격 절감에 기여할 수 있다.

[0051] (c) 본 발명의 부레옥잠 배지는 다양한 미생물에 대하여 우수한 배양배지 역할을 하며, 재조합 미생물에 대하여도 종래의 배지와 거의 동일한 성장 상태를 나타내어, 재조합 기술에서의 미생물 배양에도 적합하고, 형질전환되어 들어간 플라스미드의 안정성을 유지시킬 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0052] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0053] 실시예

[0054] 실시예 1: 부레옥잠에서의 원액 성분 추출

[0055] 부레옥잠을 알칼리 처리를 하고, 압출기를 이용 원액을 획득하였다. 더욱 상세하게는, 우선 부레옥잠을 잎, 줄기 및 뿌리 부분으로 분리하였다. 흐르는 물에 깨끗이 부레옥잠을 세척한 후, 압출기(엔젤리아 5000, (주)엔젤녹즙기)를 이용하여 고상 및 액상 부분으로 분리하였다. 고상과 액상부분을 다시 혼합한 후, 알칼리 처리를 하여 조직을 연질화 시켰다. 사용한 알칼리는 수산화칼슘과 수산화나트륨을 사용하는 것이 바람직하며, 실시예에서는 수산화나트륨을 사용하였다. 알칼리는 부레옥잠 무게비로 0.1 wt% 내지 1 wt%로 처리하는 것이 바람직하며, 실시예에서는 0.1 wt%, 0.5 wt% 및 1 wt%로 처리하여 실험을 실시하였다(하기 실험예에 사용한 부레옥잠 배지는 0.5 wt%로 처리한 것이다). 수산화나트륨 처리 후, 12-24시간 동안 냉장 보관(4℃)하였다. 다시 압출기를 이용하여, 수산화나트륨 처리된 것을 액상부분만 분리하여 미생물 배양배지로 사용하였다(참조: 도 1).

[0056] 실시예 2: 산업용 배양배지와 부레옥잠을 성분으로 하는 배양배지 원가 비교

[0057] 한편, 부레옥잠을 이용하여 제조된 미생물 배양배지의 경제성을 분석하기 위하여, 기존 산업용으로 사용되는 미생물 배양배지의 주성분과 원가를 비교하였다. LB(Luria-Bertani) 배지의 경우 리터당 3,722원, TSB(Tryptic soy broth) 배지는 리터당 5,322원, YM(Yeast Maltose) 배지는 리터당 2,233원, MRS 배지는 리터당 12,874원, GG1 배지는 리터당 3,194원이었다. 통상 부레옥잠을 압출기를 이용, 액상부분만을 분리할 경우 부레옥잠 1 kg 당 약 600 ml 정도 획득할 수 있다. 또한, 국내에서 채배되는 부레옥잠의 경우 1톤 당(수분 20% 제거) 가격이 약 10만원이다. 상기의 정보를 감안했을 때, 부레옥잠에서 추출된 원액을 성분으로 하는 배양배지는 리터당 약 200원이다(참조: 표 2a-2c).

표 2a

LB 배지			TSB 배지			YM 배지		
성분 (g/l)	단가 (원/g)	원가 (원/l)	성분 (g/l)	단가 (원/g)	원가 (원/l)	성분 (g/l)	단가 (원/g)	원가 (원/l)
트립톤 (10 g/l)	280	2,800	트립톤 (15 g/l)	280	4,200	효모 추출물 (3 g/l)	180	540
염화 나트륨 (5 g/l)	4.4	22	소이톤 (5 g/l)	220	1,100	말트 추출물 (3 g/l)	171	513
효모 추출물 (5 g/l)	180	900	염화나트륨 (5 g/l)	4.4	22	펩톤 (5 g/l)	224	1,120
-	-	-	-	-	-	글루코오스 (10 g/l)	6	60
합 계	-	3,722	합 계	-	5,322	합 계	-	2,233

[0058]

표 2b

MRS 배지			GG1 배지		
성분 (g/l)	단가 (원/g)	원가 (원/l)	성분 (g/l)	단가 (원/g)	원가 (원/l)
글루코오스 (20 g/l)	6	120	글루코오스 (15 g/l)	6	90
프로테오즈 펩톤 (10 g/l)	620	6,200	글리세롤 (15 g/l)	9.6	144
비프 추출물 (10 g/l)	540	5,400	소이 펩톤 (15 g/l)	196	2,940
효모 추출물 (5 g/l)	180	900	염화나트륨 (3 g/l)	4.4	13.2
트윈 80 (1 g/l)	12	12	탄산칼슘 (1 g/l)	7.2	7.2
암모늄 시트레이트 (2 g/l)	14.4	28.8	-	-	-
소듐 아세테이트 (5 g/l)	7.2	36	-	-	-
디포타슘 포스페이트 (2 g/l)	88	176	-	-	-
마그네슘 설페이트 (0.1 g/l)	6	0.6	-	-	-
망간네이즈 설페이트 (0.05 g/l)	11.5	0.575	-	-	-
합 계	-	1,2874	합 계	-	3,194

[0059]

표 2c

부레옥잠 원액 성분 유래 배양배지		
성분	단가 (원/g)	원가 (원/l)
부 레 옥 잠 원 액 성 분	0.1	200
합 계	-	200

[0060]

실험예 1: 부레옥잠 배양배지에서 미생물의 생육상태에 관한 실험

상기 실시예 1에서 제조된 부레옥잠 유래 배지를 이용하여, 미생물의 생육상태를 조사해 보았다. 대조군으로 는 기존에 시판되고 있는 배지를 배양배지로 사용했을 경우로 하였으며, 실험군으로는 부레옥잠 유래 배양배지 를 사용했을 경우로 하여 미생물의 생육상태를 비교하였다.

250 ml 플라스크에 부레옥잠 유래 배지를 50 ml씩 분주 하였으며, 고온습식 멸균(121℃, 15 min)을 하고 최종 수소이온 농도(즉, pH)는 3 M NaOH 및 3 M H₂SO₄ 이용하여 보정하였다.

바실러스(*Bacillus*)속 미생물로는 바실러스 리체니포르미스(*Bacillus licheniformis* KCCM 11237), 바실러스 코 아굴란스(*Bacillus coagulans* KCCM 11715), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis* IB101) 및 바실러스 메가 테리움(*Bacillus megaterium* ATCC 10778)을 사용하였으며, 대조군으로 사용된 배지는 LB 배지 및 TSB 배지이다 (조성 표 1 참조). 전배양은 TSB 배지 5 ml (시험관)에 1 wt%로 접종하여 30℃, 250 rpm으로 배양하였으며, 본배양은 LB 배지 또는 TSB 배지 50 ml (250 ml 플라스크)에 상기 배양 조건으로 1일 동안 배양하였다. 배양 후, 배양액 1 ml를 회수하여 연속적 희석(serial dilution)을 수행하였으며, LB 한천배지에 도말을 하여 생균수

를 측정하였다. 실험군으로는 부레옥잠 유래 배지를 사용하여 배양을 수행하였으며, 전배양 및 본배양의 조건은 대조군과 같다.

[0065] 대장균 미생물로는 *E. coli*(*Escherichia coli* DH5 α)를 사용하였으며, 대조군으로 사용된 배지는 LB 배지를 사용하였다(조성 표 1 참조). 전배양은 LB 배지 5 ml (시험관)에 1 wt%로 접종하여 37 $^{\circ}$ C, 200rpm으로 배양하였으며, 본배양은 LB 배지 50 ml (250 ml 플라스크)에 상기 배양 조건으로 1일 동안 배양하였다. 배양 후, 배양액 1 ml를 회수하여 연속적 희석(serial dilution)을 수행하였으며, LB 한천배지에 도말을 하여 생균수를 측정하였다. 실험군으로는 부레옥잠 유래 배지를 사용하여 배양을 수행하였으며, 전배양 및 본배양의 조건은 대조군과 같다.

[0066] 효모(yeast)속 미생물로는 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae* KCTC 7928), 스타메텔라 봄비콜라(*Starmerella bombicola* KCTC 7145)를 사용하였으며, 대조군으로 사용된 배지는 YM 배지를 사용하였다(조성 표 1 참조). 전배양은 YM 배지 5 ml (시험관)에 1 wt%로 접종하여 30 $^{\circ}$ C, 200rpm으로 배양하였으며, 본배양은 YM 배지 50 ml (250 ml 플라스크)에 상기 배양 조건으로 1-2일 동안 배양하였다. 배양 후, 배양액 1 ml를 회수하여 연속적 희석(serial dilution)을 수행하였으며, YM 한천배지에 도말을 하여 생균수를 측정하였다. 실험군으로는 부레옥잠 유래 배지를 사용하여 배양을 수행 하였으며, 전배양 및 본배양의 조건은 대조군과 같다.

[0067] 스트렙토마이세스(*Streptomyces*)속 미생물은 스트렙토마이세스 코엘리컬러(*Streptomyces coelicolor* A3(2) M145)를 사용하였으며, 대조군으로 사용된 배지는 GG1 배지를 사용하였다(조성 표 1 참조). 전배양은 GG1 배지 5 ml (시험관)에 1 wt%로 접종하여 30 $^{\circ}$ C, 220rpm으로 배양하였으며, 본배양은 GG1배지 50 ml (250 ml 플라스크)에 상기 배양 조건으로 3-4일 동안 배양하였다. 배양 후, 배양액 1 ml를 회수하여 연속적 희석(serial dilution)을수행하였으며, ISP2 한천배지(말트추출물 10.0 g/l, 효모추출물 4.0 g/l, 글루코오스 4.0 g/l, 한천 2.0% 함유)에 도말을 하여 생균수를 측정하였다. 실험군으로는 부레옥잠 유래 배지를 사용하여 배양을 수행 하였으며, 전배양 및 본배양의 조건은 대조군과 같다.

[0068] 락토바실러스(*Lactobacillus*)속 미생물로는 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum* ATCC 14917), 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei* KLB58)를 사용하였으며, 대조군으로 사용된 배지는 MRS배지를 사용하였다(조성 표 1 참조). 전배양은 MRS배지 5 ml (시험관)에 1 wt%로 접종하여 30 $^{\circ}$ C, 정지 배양하였으며, 본배양은 MRS배지 40 ml (캡 시험관)에 상기 배양 조건으로 1일 동안 배양하였다. 배양 후, 배양액 1 ml를 회수하여 연속적 희석(serial dilution)을 수행하였으며, LB 한천배지에 도말을 하여 생균수를 측정하였다. 실험군으로는 부레옥잠 유래 배지를 사용하여 본배양을 수행 하였으며, 전배양 및 본배양의 조건은 대조군과 같다.

[0069] 슈도모나스(*Pseudomonas*)속 미생물로는 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida* KCTC 2523)를 사용하였으며, 대조군으로 사용된 배지는 LB배지를 사용하였다(조성 표 1 참조). 전배양은 LB배지 5 ml (시험관)에 1 wt%로 접종하여 30 $^{\circ}$ C, 200rpm으로 배양하였으며, 본배양은 LB배지 50 ml (250 ml 플라스크)에 상기 배양 조건으로 1일 동안 배양하였다. 배양 후, 배양액 1 ml를 회수하여 연속적 희석(serial dilution)을 수행하였으며, LB 한천배지에 도말을 하여 생균수를 측정하였다. 실험군으로는 부레옥잠 유래 배지를 사용하여 배양을 수행 하였으며, 전배양 및 본배양의 조건은 대조군과 같다.

[0070] 하기 표 3a-3b에서 확인할 수 있듯이, 본 발명의 부레옥잠 배지는 바실러스 속 미생물, 대장균 미생물, 효모속 미생물, 스트렙토마이세스속 미생물, 락토바실러스속 미생물 및 슈도모나스속 미생물 모두에 대하여 우수한 배지 역할을 하였다. 상기 미생물 모두, 부레옥잠 배지에서 종래의 배지와 거의 동일한 생장 상태를 나타내었다.

[0071] 특히, 미생물의 속에 따라 종래의 배지 조성이 서로 상이한 것을 고려하면, 부레옥잠 단일 조성의 배지로서 모든 속의 미생물에 대하여 우수한 생장 상태를 나타내는 것은 매우 놀라운 실험 결과이다.

[0072] 실험예 2: 부레옥잠 배양배지에서 미생물의 플라스미드 안정성에 관한 실험

[0073] 재조합 미생물로는 *E. coli* pYES2/CT 및 *E. coli* pYES3/CT를 사용하였다(Invitrogen). 대조군으로 사용된 배지는 LB배지이며, 전배양은 LB배지 5 ml (시험관)에 100 mg/l 암피실린(DUCHEFA, 네덜란드) 20 μ l를 혼합한 후, 접종량은 1 wt%로 하여 37 $^{\circ}$ C, 200rpm으로 배양하였으며, 본배양의 경우 LB배지 50 ml (250 ml 플라스크)에 상기 배양 조건으로 1일 동안 배양하였다. 배양 후, 배양액 1ml를 회수하여 연속적 희석(serial dilution)을 수행하였으며, LB 한천배지(암피실린 처리한 것과 안한 것)에 도말을 하여 그 생균수를 측정 및 비교하였다. 실험군으로는 부레옥잠 유래 배지를 사용하여 배양을 수행 하였으며, 전배양 및 본배양의 조건은 대조군과 같다.

[0074]

표 3a-3b에서 확인할 수 있듯이, 본 발명의 부레옥잠 배지는 재조합 미생물에 대하여도 종래의 배지와 거의 동일한 성장 상태를 나타내어, 재조합 기술에서의 미생물 배양에도 적합하다는 것을 알 수 있다.

표 3a

배지 미생물	산업용 배양배지 (대조군)				실험군			
<i>Bacillus</i> 속 미생물	TSB배지		LB배지		부레옥잠 원액배지			
<i>Bacillus licheniformis</i>	2.11 × 10 ⁹	1.95 × 10 ⁹	1.65 × 10 ⁹	2.20 × 10 ⁹	1.14 × 10 ⁹		5.0 × 10 ⁸	
<i>Bacillus coagulans</i>	5.45 × 10 ⁸	5.80 × 10 ⁸	3.10 × 10 ⁸	3.60 × 10 ⁸	3.38 × 10 ⁹		3.16 × 10 ⁹	
<i>Bacillus subtilis</i>	5.80 × 10 ⁸	5.30 × 10 ⁸	6.60 × 10 ⁸	6.45 × 10 ⁸	1.44 × 10 ⁹		1.07 × 10 ⁹	
<i>Bacillus megaterium</i>	1.60 × 10 ⁸	2.65 × 10 ⁸	8.50 × 10 ⁸	9.50 × 10 ⁸	1.40 × 10 ⁸		2.45 × 10 ⁸	
대장균 미생물	TSB배지		LB배지		부레옥잠 원액배지			
<i>Escherichia coli</i>	2.20 × 10 ⁹	2.60 × 10 ⁹	2.65 × 10 ⁹	1.70 × 10 ⁹	7.40 × 10 ⁸		5.50 × 10 ⁸	
재조합 미생물	LB배지				부레옥잠 원액배지			
배지내 암피실린 처리 (0/X)	0	X	0	X	0	X	0	X
<i>Escherichia coli</i> pYES2/CT	2.16 × 10 ⁹	2.10 × 10 ⁹	2.70 × 10 ⁹	1.77 × 10 ⁹	6.35 × 10 ⁸	8.70 × 10 ⁸	4.65 × 10 ⁸	4.00 × 10 ⁸
<i>Escherichia coli</i> pYES3/CT	4.36 × 10 ⁹	2.59 × 10 ⁹	5.11 × 10 ⁹	2.92 × 10 ⁹	1.93 × 10 ⁹	2.80 × 10 ⁹	1.05 × 10 ⁹	9.00 × 10 ⁸

[0075]

표 3b

배지 미생물	산업용 배양배지 (대조군)		실험군	
Yeast속 미생물	YM배지		부레옥잠 원액배지	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.15 $\times 10^8$	1.07 $\times 10^8$	1.14 $\times 10^8$	1.31 $\times 10^8$
<i>Starmerella bombicola</i>	1.65 $\times 10^9$	2.29 $\times 10^9$	8.0 $\times 10^8$	6.10 $\times 10^8$
<i>Streptomyces</i> 속 미생물	GG1배지		부레옥잠 원액배지	
<i>Streptomyces coelicolor</i>	8.05 $\times 10^8$	1.06 $\times 10^9$	9.11 $\times 10^8$	9.58 $\times 10^8$
<i>Lactobacillus</i> 속 미생물	MRS배지		부레옥잠 원액배지	
<i>Lactobacillus plantarum</i>	2.81 $\times 10^9$	2.49 $\times 10^9$	9.50 $\times 10^8$	8.35 $\times 10^8$
<i>Lactobacillus paracasei</i>	4.50 $\times 10^9$	4.95 $\times 10^9$	5.60 $\times 10^8$	4.60 $\times 10^8$
<i>Pseudomonas</i> 속 미생물	LB배지		부레옥잠 원액배지	
<i>Pseudomonas putida</i>	7.30 $\times 10^8$	3.37 $\times 10^9$	4.12 $\times 10^9$	3.88 $\times 10^9$

[0076]

[0077] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0078] 도 1은 본 발명에 따른 부레옥잠 전처리 및 미생물 배양에 관한 플로우 차트이다.

도면

도면1

