

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2012-0026730 (43) 공개일자 2012년03월20일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 1/38 (2006.01) C12N 1/20 (2006.01) C12R 1/07 (2006.01) C12R 1/465 (2006.01)		(71) 출원인 인하대학교 산학협력단 인천광역시 남구 인하로 100, 인하대학교 (용현동)
(21) 출원번호 10-2010-0088794		(72) 발명자 김은기 서울특별시 양천구 목동 131-506 유지혁 서울특별시 은평구 불광로 179-14 (불광동)
(22) 출원일자 2010년09월10일 심사청구일자 2010년09월10일		(74) 대리인 이원희

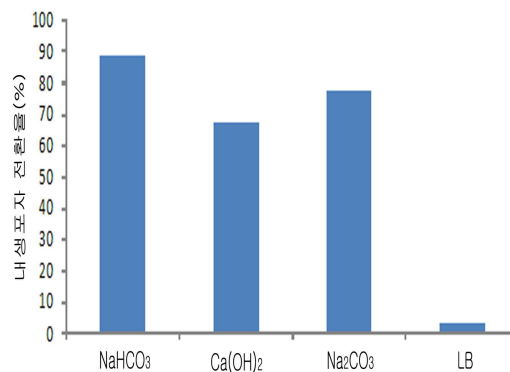
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **감귤박 추출물을 포함하는 포자형성 촉진 배지**

(57) 요약

본 발명은 감귤박 추출물을 포함하는 미생물 배양 배지에 관한 것으로, 보다 구체적으로 감귤박을 수산화칼슘($\text{Ca}(\text{OH})_2$), 탄산수소나트륨(NaHCO_3), 탄산나트륨(Na_2CO_3), 및 수산화나트륨(NaOH)을 이용하여 추출한 결과, 종래에 감귤박 추출에 사용된 수산화칼슘에 비하여, 탄산수소나트륨을 이용한 감귤박 추출물의 내생포자 형성능력이 우수함을 확인할 수 있었다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 200901FHT010406240

부처명 농림수산식품부

연구사업명 바이오그린 21사업

연구과제명 감귤박 배지를 활용한 항생제 대체제 개발

주관기관 인하대학교 산학협력단

연구기간 2009.01.01 ~ 2011.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

감귤박 추출물을 유효성분으로 함유하는 포자형성 촉진 배지 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 감귤박 추출물은 탄산수소나트륨(NaHCO_3), 탄산나트륨(Na_2CO_3), 및 수산화나트륨(NaOH)으로 이루어진 군에서 선택되는 알칼리성 경화제를 첨가하여 추출되는 것을 특징으로 하는 포자형성 촉진 배지 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 감귤박 추출물은 포자형성 촉진 배지 조성물 전체 부피에 3 내지 10 중량부가 포함되는 것을 특징으로 하는 포자형성 촉진 배지 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 생균제는 대장균, 바실러스(*Bacillus*)속, 및 스트렙토마이세스(*Streptomyces*)속 미생물로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나로부터 유래된 것을 특징으로 하는 포자형성 촉진 배지 조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서, 바실러스속 미생물은 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 및 바실러스 리체니포르미스(*Bacillus licheniformis*)로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 포자형성 촉진 배지 조성물.

청구항 6

제 4항에 있어서, 스트렙토마이세스속 미생물은 스트렙토마이세스 카슈젠시스(*Streptomyces kasugaensis*)인 것을 특징으로 하는 포자형성 촉진 배지 조성물.

청구항 7

- 1) 감귤박을 분쇄 및 압출하는 단계;
- 2) 단계 2)의 분쇄 및 압출된 감귤박을 알칼리성 경화제를 이용하여 추출하는 단계;
- 3) 단계 2)의 감귤박 추출물을 압축하여 고상부분과 액상부분으로 분리하는 단계; 및
- 4) 단계 3)의 분리된 액상부분을 함유하는 배지를 제조하는 단계를 포함하는 포자형성 촉진 배지 조성물 제조 방법.

청구항 8

제 7항에 있어서, 단계 2)의 알칼리성 경화제는 수산화칼슘($\text{Ca}(\text{OH})_2$), 탄산수소나트륨(NaHCO_3), 탄산나트륨(Na_2CO_3), 및 수산화나트륨(NaOH)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 포자형성 촉진 배지 조성

물 제조 방법.

청구항 9

제 7항에 있어서, 단계 2)의 알칼리성 경화제는 0.01 내지 0.05 mol 처리하여 수득되는 것을 특징으로 하는 포자형성 촉진 배지 조성물 제조 방법.

청구항 10

제 7항에 있어서, 단계 4)의 분리된 액상부분은 포자형성 촉진 배지 조성물 전체 부피에 3 내지 10 중량부가 포함되는 것을 특징으로 하는 포자형성 촉진 배지 조성물 제조 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 사료 첨가용 생균제 발효를 위한 폐감귤박 추출법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 생균제로 사용되는 포자형태의 균을 고농도로 얻기 위한 폐감귤박 추출법 및 그의 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 국내에서 생산되는 대부분의 감귤(*Citrus retiula*)은 연간 10만 톤이 제주도에서 생산되며 생과용으로 80%, 가공용으로 20% 소비되고 있는데 최근 감귤의 과잉생산체제로 인하여 소득성이 낮아지면서 부가가치를 높일 수 있는 가공식품 개발이나 기능성 식품으로서의 가치를 개발하는데 관심이 높아지고 있다. 그 예로써 균 발효를 이용한 감귤식초, 감귤 요구르트, 혼합 과실 음료 등을 들 수 있고, 그중에서는 90%가 주스용으로 이용되고 있다(농림통계연보, 농림부, p.86, 1993).

[0003] 상기 주스 제조 공정 중 50%의 감귤주스 가공폐기물이 얻어지고 있는데, 연간 5만 톤의 양이다. 이들 부산물은 극히 일부만이 사료 또는 한약재로 사용될 뿐 대부분이 해양투기 되어 토양, 수질오염의 원인이 되고 있는 실정이다. 따라서 감귤주스 가공폐기물을 처리하기 위한 방안으로써 감귤박이 가지고 있는 많은 유효성분들에 대해 활발히 연구되고 있다(Park YK. et al., J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 25, 4, 659-664, 1996). 그 중 큰 부분을 차지하는 것이 펙틴(pectin)과 바이오플라보노이드(bioflavonoid)이다.

[0004] 감귤박에는 펙틴, 플라보노이드, 알칼로이드, 헤스페리딘 및 비타민 등이 함유되어 있는 것으로 알려져 있다. 이들은 해독, 혈중 콜레스테롤 함량을 저하, 항균, 항염, 면역력을 높여주는 효능을 나타내므로 그 중요성이 강조되고 있다. 따라서, 최근에는 감귤박을 효과적으로 처리하는 방법들이 다각도로 연구되고 있으며, 감귤박을 분쇄하여 발효시키거나 건조시켜서 사료나 비료 또는 퇴비로 만드는 방법 및 감귤박 발효사료 생산장치 등이 연구되고 있다.

[0005] 이러한 유효성에도 불구하고, 하루 400톤이라는 엄청난 양을 처리하기 위한 방안으로 다량의 공급과 수요를 가지는 사료 개발이 활발히 이루어지고 있다. 감귤 가공부산물의 90%가 수분으로 장기간 저장에 힘들고, 페니실리움 카멤베르티(*Penicillium camemberti*), 페니실리움 로크웨티(*Penicillium roqueforti*) 등에 감염되어 부패하기 쉽기 때문에(Secrra, V. Aniaml Feed Science and Technology 78:169-176, 1998) 현재 대부분이 펠렛(pellet) 형태의 건조 사료로써 사용이 되고 있다(Kang T.H. et al., J. Agri. Sci. 36(1):512-516, 1994). 그러나 펠렛 생산공정은 압출식 탈수과정 중에 고농도 유기물 액상(BOD 50,000 ppm)이 발생하는데, 이는 수질 환경에 문제가 될 수 있는 폐수이며 또한 펙틴(pectin) 및 기능성 물질이 다량 함유되어 있기 때문에 이를 재활용하려는 노력이 요구된다.

- [0006] 이런 문제의 해결책으로써 균 발효를 통해 고부가가치의 생균제(probiotics) 사료 생산이 제시되고 있다. 기존의 사료시장은 축산업에서 성장 촉진, 사료 전환(feed conversion) 효율성 증대, 및 장내 감염 방지 등을 목적으로 항생제를 광범위하게 사용하여 유익한 장내 미생물 생태계의 불균형과 항생제 내성 균주의 출현을 초래하였다. 최근 유럽 위원회(European commission)는 동물의 성장 촉진제로 사료에 첨가되는 항생제의 사용을 금지하였으며, 특히 양계에서는 병원균 차단을 위해 항균력을 갖는 정장제를 적극 권장하고 있는 실정이다. 이런 문제점에 대한 해결책으로 항생제 대체제로써 항균성 물질을 생산하는 생균제가 대두 되고 있다.
- [0007] 생균제(probiotics)는 장내 미생물 균형에 도움을 주는 미생물, 항균 활성화와 효소 활성을 가진 미생물, 및 그들이 내는 생산물을 말한다(Fuller, R. J Appl Bacteriol. 66(5):365-378, 1989). 아울러, 생균제는 사람이나 동물에 건조된 세포형태나 발효 산물 형태로 공급되어 사람이나 동물 숙주의 장내 균총을 개선함으로써 좋은 영향을 주는 단일 또는 복합 균주 형태의 생균으로 정의되고 있다. 이러한 사료첨가용 생균제는 유해균이 장관 벽에 부착하는 것을 방지하고 유기산, 항균물질, 효소 등을 생산하여 면역능력을 증진시킨다. 현재 사용되는 생균제 균주로는 주로 그람양성균인 락토바실러스, 스트렙토코커스, 바실러스, 클로스트리디움 속과 곰팡이, 효모 등이 사용되고 있다. 생균제가 갖추어야 할 특성은 인간의 장내를 서식지로 하고, 비병원성, 무독성, 장으로 가는 동안 살아 남아야한다. 더 나아가서 전달 식품 안에서 소비되기 전에 생존율과 활성을 유지 및 감염 예방으로 사용되는 항생제에 대해 민감해야하며, 항생제 내성을 갖는 플라스미드를 보유하지 않아야 한다. 또한, 장내 환경에서 산, 효소, 담즙에 대한 내성을 갖추어야한다(Mishra, C. et al., Asia Pacific J Clin Nutr. 5:20-24, 1996).
- [0008] 내생포자는 간균이며 호기성인 바실러스(Bacillus)속과 혐기성인 클로스트리디움(Clostridium) 속, 그리고 구균인 스포로사시나(Sporosarcina) 속에 해당하는 여러 세균종의 영양세포 내에서 발생한다. 그람음성인 스포로무사(Sporomusa) 속 등에서도 형성되며, 포자의 구조는 균주에 따라 서로 다르다. 세포 내에서 형성되는 내생포자는 열, 자외선, 감마선, 화학 살균제, 건조한 환경 등의 불리한 환경조건에서 아주 잘 견딘다. 내생포자를 형성하는 세균들은 주로 토양에서 발견되며, 어떤 내생포자는 100,000년가량 생존해 있을 수 있으며, 방선균(antimycete)의 포자는 진흙 속에 7,500년 동안 묻혀 있다 다시 발아하기도 하였다. 내생포자가 열악한 조건에서도 잘 견디고, 내생포자 형성 세균 중에는 위험한 병원균이 여러 종류 있기 때문에 내생포자는 식품미생물, 산업미생물, 의학미생물 등의 여러 분야에 걸쳐 실용적인 면에서 중요한 의미를 지닌다.
- [0009] 내생포자 형성을 촉진하는 배지 조성물은 사료 첨가제로써 유용하게 사용될 수 있다. 이는 기존의 대부분의 사료 첨가제에 포함되어 있는 미생물제들이 살아있는 미생물(세균,곰팡이)을 함유하고 있어 고온, pH, 자외선, 각종 항생제 등에 매우 민감하여 쉽게 활성을 잃어버려 본래의 효과가 나타나지 않으나, 포자 형성균으로부터 획득된 내생 포자(endospore)는 생균의 활성화에 영향을 미치는 각종 악조건인 열, pH, 자외선, 각종 항생제 등에도 탁월한 안정성을 가지므로 장관까지 살아서 도달하여 생균의 고유한 특성 확실하게 발휘하게 된다. 또한, 사료 첨가제로 제조되는 공정에서도 살아있는 미생물제에 비하여, 안정성이 뛰어나다는 장점이 있다.
- [0010] 이전에 보고된 폐감귤박의 압출 건조 공정에서는 폐감귤박의 섬유질을 경화시켜 압출시 섬유질과 물이 분리할 수 있도록 도와주는 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 0.5% 처리시 pH가 8 이상으로 증가함을 확인하였고, 결과적으로 압출 건조 공정에서 발생한 폐감귤박 침출수는 바실러스 종이 성장할 수 있는 배지가 될 수 있다. 하지만 사료첨가제로 사용되는 물질에 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 를 첨가하게 되면 칼슘의 과다 섭취로 인하여, 체내의 칼슘 농도가 높아지고 콜레스테롤과 담즙 등과 함께 담석을 형성할 가능성이 있다. 특히 다량의 칼슘을 포함하는 경우에는 콜레스테롤이 핵이 되어 생성되는 콜레스테롤 담석, 빌리루빈을 주성분으로 하는 색소 담석, 탄산 칼슘석, 지방산 칼슘석 등이 생성하는 연질에 기름기가 포함된 담석과는 다르게 딱딱한 담석이 생성하게 된다.
- [0011] 상기와 같은 담석이 생성되면 담즙의 배출장애로 인한 소화 장애나 가스가 차는 등의 증세가 나타나고, 심해지

면 위경련, 급체, 토사곽란 등이 자주 일어나고, 다른 합병증이나 담낭암을 유발할 가능성이 커진다. 또한 담관에 담석이 생성되면 우리 몸의 화학공장이라 일컬어지며 각종 독소의 해독작용과 단백질의 합성 등을 담당하는 간의 기능저하를 초래하게 된다.

[0012] 이에, 본 발명자들은 이전에 사용되고 있던 0.5% $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 의 위의 문제를 해결하고 향상된 추출방법을 가지며, 더 나아가 생균제로 사용되는 포자형태의 균을 고농도로 생산할 수 있는 더 이로운 효과를 가져 올 수 있는 방안을 제공하기 위하여, 감귤박에 탈수 효과가 있는 물질을 첨가하여 생균제 발효를 위한 액상배지의 수율을 최대화하고, 생균제로 사용되는 다양한 균주의 발효를 통해 프로바이오틱에 필수적인 포자형성 촉진 유도를 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명의 목적은 감귤박 추출물을 유효성분으로 함유하는 포자형성 촉진 배지 조성물을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 미생물 배양 배지 제조 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 본 발명은 감귤박 추출물을 유효성분으로 포함하는 포자형성 촉진 배지 조성물을 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 포자형성 촉진 배지 조성물 제조 방법을 제공한다:

- [0017] 1) 감귤박을 분쇄 및 압출하는 단계;
- [0018] 2) 단계 2)의 분쇄 및 압출된 감귤박을 알칼리성 경화제를 이용하여 추출하는 단계;
- [0019] 3) 단계 2)의 감귤박 추출물을 압축하여 고상부분과 액상부분으로 분리하는 단계; 및
- [0020] 4) 단계 3)의 분리된 액상부분을 함유하는 배지를 제조하는 단계.

발명의 효과

[0021] 본 발명의 감귤박을 탄산수소나트륨(NaHCO_3)을 이용하여 추출물을 유효성분으로 함유하는 배지는 생균제용 균주의 내생포자 전환율이 우수하므로, 포자형성 촉진 배지 조성물 및, 이를 이용하여 생성되는 생균제를 사료첨가제 및 사료로서 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은 감귤박 추출방법에 따른 바실러스 리케니포미스의 내생포자 전환율(%)을 비교한 그래프이다.

도 2는 NaHCO_3 를 이용하여 추출한 감귤박 배지의 내생포자 전환율(%)을 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0024] 본 발명은 감귤박 추출물을 유효성분으로 포함하는 포자형성 촉진 배지 조성물을 제공한다.

[0025] 상기 포자형성 촉진 배지 조성물에 있어서, 감귤박 추출물은 수산화칼슘($\text{Ca}(\text{OH})_2$), 탄산수소나트륨(NaHCO_3), 탄

산나트륨(Na_2CO_3), 및 수산화나트륨(NaOH)으로 이루어진 군에서 선택되는 알칼리성 경화제를 첨가하여 추출되는 것이 바람직하며, 탄산수소나트륨(NaHCO_3)을 첨가하여 추출되는 것이 가장 바람직하나, 이에 한정되지 않는다. 감귤박 추출물에 이용되는 알칼리성 경화제로서 수산화칼슘($\text{Ca}(\text{OH})_2$), 탄산나트륨(Na_2CO_3), 및 수산화나트륨(NaOH)이 알려져 있으나, 상기 3가지 물질을 첨가하여 추출한 감귤박 추출물을 함유하는 배지에 비하여, 본 발명의 탄산수소나트륨(NaHCO_3)을 첨가하여 추출되는 감귤박 배지에서 생균제로 사용되는 포자 형태의 균을 보다 고농도로 생성하는 효과를 보였다.

[0026] 또한, 상기 포자형성 촉진 배지 조성물에 있어서, 감귤박 추출물은 포자형성 촉진 배지 조성물 전체 부피에 3 내지 10 중량부가 포함되는 것이 바람직하며, 5 중량부가 포함되는 것이 더욱 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0027] 또한, 상기 포자형성 촉진 배지 조성물에 있어서, 생균제는 대장균, 바실러스(*Bacillus*)속, 및 스트렙토마이세스(*Streptomyces*)속 미생물로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나로부터 유래된 것이 바람직하며, 바실러스(*Bacillus*)속, 및 스트렙토마이세스(*Streptomyces*)속 미생물로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나로부터 유래된 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다. 보다 구체적으로, 바실러스속 미생물은 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 및 바실러스 리케니포르미스(*Bacillus licheniformis*)로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않으며, 스트렙토마이세스속 미생물은 스트렙토마이세스 카슈겐시스(*Streptomyces kasugaensis*)인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0028] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 감귤박(750 g)을 수산화칼슘($\text{Ca}(\text{OH})_2$), 탄산수소나트륨(NaHCO_3), 탄산나트륨(Na_2CO_3), 및 수산화나트륨(NaOH)을 이용하여 추출하였으며(표 1 참조), 이를 이용하여 배지를 제조하였다. 감귤박 추출물을 함유하는 배지의 내생포자 형성능을 비교하기 위하여, 이를 포함하고 있지 않은 일반 LB 배지와 Benett 배지를 제조하였다. 감귤박 추출 방법에 따른 내생포자 형성능을 비교하기 위하여, 각각의 추출 방법으로 추출물을 함유하는 배지에 바실러스 리케니포르미스(*Bacillus licheniformis*) 균주를 접종하여 배양한 결과, 탄산나트륨을 이용하여 추출한 감귤박 추출물을 함유하는 배지에서 내생 포자 전환율이 가장 뛰어나함을 확인할 수 있었다(표 2, 및 도 1 참조).

[0029] 또한, 본 발명이 구체적인 실시예에서, 탄산나트륨을 이용하여 추출한 감귤박 배지의 다양한 프로바이오틱 균주의 포자 형성률에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, 바실러스 리케니포르미스 이외에 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)와 스트렙토마이시스 카슈겐시스(*Streptomyces kasugaensis*)의 포자 형성률을 비교하였다. 감귤박 배지에 상기 3가지 종류의 균주를 각각 접종하여 배양하였으며, 감귤박 배지에 대한 대조군으로써, 일반 상업용 배지인 LB 배지 및 Benett 배지에 상기 균주를 각각 접종하여 내생포자 전환율을 비교하였다. 그 결과, 도 2 및 표 3에 나타난 바와 같이, LB 배지 및 Benett 배지에 비하여 감귤박 배지에서 내생 포자 전환율이 현저하게 높았으며, 바실러스 리케니포르미스의 경우 감귤박 배지에서 LB 배지에 비하여 내생포자 전환율이 약 27배 정도 높았으며, 바실러스 서브틸리스는 LB 배지보다 감귤박 배지에서 약 2.2배 내생포자 전환율이 높았다. 또한, 스트렙토마이시스 카슈겐시스는 감귤박 배지에서 내생포자 전환율이 Benett 배지에 비하여 약 6배 높았다(도 2 및 표 3 참조).

[0030] 따라서, 본 발명의 감귤박 추출물을 유효성분으로 함유하는 배지는 바실러스 리케니포르미스, 바실러스 서브틸리스, 및 스트렙토마이시스 카슈겐시스와 같은 프로바이오틱 균주의 포자 형성률이 우수하므로, 광범위한 포자형성 촉진 배지 조성물로서 유용하게 이용될 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 포자형성 촉진 배지 조성물에서 배양된 생균제를 사료 첨가제 또는 사료로서 사용할 수 있다.

[0031] 또한, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 포자형성 촉진 배지 조성물 제조 방법을 제공한다:

[0032] 1) 감귤박을 분쇄 및 압출하는 단계;

[0033] 2) 단계 2)의 분쇄 및 압출된 감귤박을 알칼리성 경화제를 이용하여 추출하는 단계;

[0034] 3) 단계 2)의 감귤박 추출물을 압축하여 고상부분과 액상부분으로 분리하는 단계; 및

[0035] 4) 단계 3)의 분리된 액상부분을 함유하는 배지를 제조하는 단계.

- [0036] 상기 포자형성 촉진 배지 조성물에 있어서, 단계 2)의 알칼리성 경화제는 수산화칼슘($\text{Ca}(\text{OH})_2$), 탄산수소나트륨(NaHCO_3), 탄산나트륨(Na_2CO_3), 및 수산화나트륨(NaOH)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않으며, 알칼리성 경화제는 0.01 내지 0.05 mol 처리하여 수득되는 것이 바람직하며, 0.035 mol 처리하여 수득되는 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 또한, 단계 4)의 분리된 액상부분은 포자형성 촉진 배지 조성물 전체 부피에 3 내지 10 중량부가 포함되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0037] 따라서, 본 발명의 감귤박 추출물을 유효성분으로 함유하는 배지는 바실러스 리케니포미스, 바실러스 서브틸리스, 및 스트렙토마이시스 카우젠시스와 같은 프로바이오틱 균주의 포자 형성률이 우수하므로, 광범위한 포자형성 촉진 배지 조성물로서 유용하게 이용될 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 포자형성 촉진 배지 조성물에서 배양된 생균제를 사료 첨가제 또는 사료로서 사용할 수 있다.
- [0038] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.
- [0039] 단, 하기의 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기의 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.
- [0040] <실시예1> 감귤박 추출물의 제조
- [0041] <1-1> $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 를 이용한 감귤박 추출물의 제조
- [0042] 제주도 감귤주스 공장에서 가공품을 생산하고 배출되는 가공폐기물인 폐감귤박(제주도, 감귤가공복합처리단지; 90% 수분함량)을 1차 2차에 걸친 분쇄 및 압출공정을 실시한 감귤박 750 g에 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (0.5% w/w) 0.05 mol 을 첨가하여 상온에서 저어주면서 3시간 동안 추출하였다. 이 추출물을 압출공정을 통하여 고상부분 42%와 액상부분 58%로 분리하였다. 고상은 열풍건조와 펠렛(pellet) 성형을 통하여 수분함량 5%의 CPP(citrus pulp pellet)을 생산하고, 액상(폐감귤박 가공폐수, Citrus waste water)은 균 배양배지로 이용하여 본 실험을 수행하였다
- [0043] <1-2> NaHCO_3 를 이용한 감귤박 추출물의 제조
- [0044] 제주도 감귤주스 공장에서 가공품을 생산하고 배출되는 가공폐기물인 폐감귤박(제주도, 감귤가공복합처리단지; 90% 수분함량)을 1차 2차에 걸친 분쇄 및 압출공정을 실시한 감귤박 750 g에 NaHCO_3 0.08 mol을 첨가하여 상온에서 저어주면서 3시간 동안 추출하였다. 상기 추출물을 압출공정을 통하여 고상부분 57%와 액상부분 43%로 분리하였다. 고상은 열풍건조와 펠렛(pellet) 성형을 통하여 수분함량 5%의 CPP(citrus pulp pellet)을 생산하고, 액상(폐감귤박 가공폐수; Citrus waste water)은 균 배양배지로 이용하여 본 실험을 수행하였다
- [0045] <1-3> Na_2CO_3 를 이용한 감귤박 추출물의 제조
- [0046] 제주도 감귤주스 공장에서 가공품을 생산하고 배출되는 가공폐기물인 폐감귤박(제주도, 감귤가공복합처리단지; 90% 수분함량)을 1차 2차에 걸친 분쇄 및 압출공정을 실시한 감귤박 750 g에 Na_2CO_3 0.035 mol을 첨가하여 상온에서 저어주면서 3시간동안 추출하였다. 상기 추출물을 압출공정을 통하여 고상부분 70% 와 액상부분 30%로 분리하였다. 고상은 열풍건조와 펠렛(pellet) 성형을 통하여 수분함량 5%의 CPP(citrus pulp pellet)을 생산하고, 액상(폐감귤박 가공폐수; Citrus waste water)은 균 배양배지로 이용하여 본 실험을 수행하였다
- [0047] <1-4> NaOH 를 이용한 방법
- [0048] 제주도 감귤주스 공장에서 가공품을 생산하고 배출되는 가공폐기물인 폐감귤박(제주도, 감귤가공복합처리단지; 90% 수분함량)을 1차, 2차에 걸친 분쇄 및 압출공정을 실시한 감귤박 750 g에 NaOH 0.044 mol을 첨가하여 상온에서 저어주면서 3시간 동안 추출하였다. 상기 추출물을 압출공정을 통하여 고상부분 85% 와 액상부분 15%로 분리하였다. 고상은 열풍건조와 펠렛(pellet) 성형을 통하여 수분함량 5%의 CPP(citrus pulp pellet)을 생산하

고, 액상(폐감귤박 가공폐수; Citrus waste water)은 균 배양배지로 이용하여 본 실험을 수행하였다.

표 1

각 첨가제에 따른 감귤박 추출

구 분	사용량(mol)	pH	고상부분(g)	액상부분		
				무게(g)	고형분 함량(%)	당도(Brix)
무처리	-	4.36	606.70	99.26	45.0	18.5
Ca(OH) ₂	0.050	6.61	310.30	424.76	11.4	15
NaHCO ₃	0.080	6.6	386.90	281.07	16.8	15
Na ₂ CO ₃	0.035	6.74	501.50	218.00	17.2	14.3
NaOH	0.044	6.65	593.27	100.32	43.2	17.3

<실시예 2> 각종 배지의 제조

바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)와 바실러스 리케니포미스(*Bacillus licheniformis*) 균주를 배양하기 위해 LB(Luria-Bertani) 배지[10 g 박토트립톤, 5 g 박토-효모, 5 g NaCl, pH 7.5](Difco, Co)를 사용하였다. 감귤박 배지는 <실시예 1>에서 사용된 방법으로 확보한 액상추출액의 고형분을 여과된 증류수를 사용하여 최종 5%로 하고, pH는 7.0로 적정하였다.

<2-1> LB 배지 제조

박토-트립톤 10g, 박토-효모 5g, NaCl 5 g을 비커에 넣고, H₂O로 1000 ml이 되게 부은 다음에 자동 증압 멸균하여 각 250 ml 플라스크에 50 ml씩 분주하여 제조하였다.

고체 배지의 경우 박토-트립톤 10 g, 박토-효모 5 g, NaCl 5 g, 영양성 아가 분말 15 g을 넣고, H₂O로 1000 ml이 되게 부은 다음에 자동 증압 멸균하여 멸균된 페트리접시에 상기 혼합물 약 20 ml 씩을 분주한 후에 상온에서 굳혔다.

<2-2> 베넷(Bennett) 배지의 제조

박토-효모 1 g, 박토-비프 추출액 1 g, 박토-카사미노산 2 g, 텍스트로즈 10 g을 비커에 넣고, H₂O로 1000 ml이 되게 부은 다음에 자동 증압 멸균하여 각 250 ml 플라스크에 50 ml씩 분주하여 제조하였다.

고체 배지의 경우 박토-효모 1 g, 박토-비프 추출액 1 g, 박토-카사미노산 2 g, 텍스트로즈 10 g, 영양성 아가 분말 15 g을 넣고, H₂O로 1000 ml 이 되게 부은 다음에 자동 증압 멸균하여 멸균된 페트리접시에 상기 혼합물 약 20 ml씩 분주한 후에 상온에서 굳혔다.

<2-3> 감귤박 배지의 제조

상기 <실시예 1>에서 사용된 방법으로 확보한 액상추출액의 고형분을 여과된 증류수를 사용하여 최종 5%(w/v)로 하고, pH는 7.0으로 적정하였다. 준비된 배지를 250 ml 삼각플라스크에 50 ml씩 분주하고 자동 증압 멸균하여 제조하였다.

<실험예 1> 감귤박 추출방법에 따른 내생포자 형성능 확인

상기 <실시예 2>에 따라 만들어진 배지의 바실러스 리케니포미스(*Bacillus licheniformis*, ATCC 14580)의 내생포자 형성능을 확인하였다. 바실러스 리케니포미스(*Bacillus licheniformis*) 균주를 5 ml LB 배지에 전 배양

(200 rpm, 30℃, 18시간)하여, <실시예 1>의 방법으로 만들어진 감귤 배지와 LB 배지 50 ml에 1%의 비율(v/v)로 접종하였고, 전배양과 동일한 조건에서 48시간 동안 배양하였다.

[0062] 내생포자 수를 측정하기 위해, 상기 48시간 배양한 균주를 80℃, 15분간 열처리 후 생균수를 측정하였고, 열처리 전 생균수와 비교하여 내생포자 전환정도를 측정하였다.

[0063] 그 결과, 하기 표 2 및 도 1에 나타나있듯이, LB 배지에서 배양시 포자의 형성이 안 되는 것에 반해 감귤박 배지 사용시 특히 NaHCO₃를 처리한 배지에서 89.06%의 뛰어난 포자 형성률을 보였다(표 2 및 도 1).

표 2

[0064] 감귤박 추출방법에 따른 바실러스 리케니포미스의 내생포자 형성능

구 분	총 균수(CFU/mL)	내생포자수(CFU/mL)	내생포자 전환율
NaHCO ₃	7.1 × E+08	6.3 × E+08	89.06
Ca(OH) ₂	7.4 × E+08	5.0 × E+08	67.14
Na ₂ CO ₃	7.2 × E+08	5.6 × E+08	77.52
LB	2.3 × E+08	8.0 × E+06	3.44

[0065] <실험예 2> NaHCO₃로 추출한 감귤박 배지를 이용한 다양한 프로바이오틱 균주의 포자형성률 측정

[0066] 상기 <실험예 1>에서 보여준 NaHCO₃ 처리 감귤박 배지를 이용하여 바실러스 리케니포미스(*Bacillus licheniformis*, ATCC 14580), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 스트렙토마이시스 카수젠시스(*Streptomyces kasugaensis*, ATCC 15715)의 포자 형성률을 확인 하였다.

[0067] 바실러스 리케니포미스(*Bacillus licheniformis*)와 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)의 내생포자 수를 측정하기 위해 48시간 배양한 균주를 80℃, 15분간 열처리 후 생균수를 측정하였고, 열처리 전 생균수와 비교하여 내생포자 전환정도를 측정하였다. 스트렙토마이시스 카수젠시스(*Streptomyces kasugaensis*)의 내생포자 수를 측정하기 위해 120시간 배양한 균주를 80℃, 15분간 열처리 후 생균수를 측정하였고, 열처리 전 생균수와 비교하여 내생포자 전환정도를 측정하였다.

[0068] 그 결과, 하기 표 3 및 도 2에 나와있듯이 LB 및 베넷(Bennett)과 같은 상업용 배지에서 배양시 포자의 형성이 매우 소량인 것에 반해 생균제로 사용되는 세 가지 균주 모두 NaHCO₃를 이용하여 추출한 감귤박 배지 사용시 포자 형성률이 매우 뛰어난 것을 볼 수 있다(표 3 및 도 2).

표 3

[0069] NaHCO₃ 처리 감귤박 배지를 이용한 다양한 생균제의 포자형성률

구 분		총 균수(CFU/mL)	내생포자수(CFU/mL)	내생포자 전환율(%)
<i>Bacillus licheniformis</i>	NaHCO ₃	4.9 × E+08	4.0 × E+08	82.22
	LB	2.3 × E+08	8.0 × E+06	3.44
<i>Bacillus subtilis</i>	NaHCO ₃	3.5 × E+08	2.7 × E+08	76.19
	LB	1.5 × E+07	5.0 × E+06	33.33
<i>Streptomyces kasugaensis</i>	NaHCO ₃	2.9 × E+07	1.3 × E+07	45.98
	Bennett	1.4 × E+07	1.3 × E+06	8.74

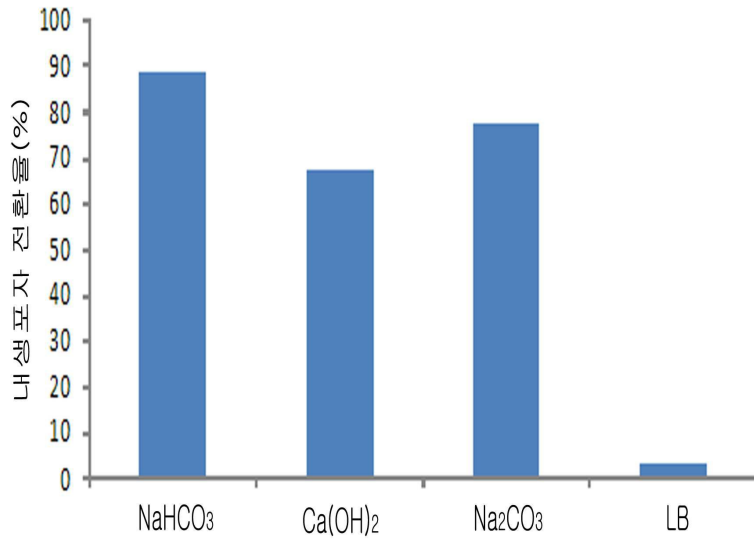
산업상 이용가능성

[0070]

상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명에 따른 감귤박 추출물을 포함하는 미생물 배양 배지는 탄산수소나트륨 등의 알칼리성 경화제를 첨가하여 액상 백지의 수율을 최대화하였으며, 또한 생균제로 사용되는 포자형태의 균을 고농도로 생산할 수 있으므로 포자형성 촉진 배지 조성물 및, 이를 이용하여 생성되는 생균제를 사료첨가제 및 사료로서 유용하게 사용될 수 있다.

도면

도면1



도면2

