

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2012-0103021 (43) 공개일자 2012년09월19일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12P 7/06 (2006.01) C12N 1/16 (2006.01) C12N 1/14 (2006.01) C12R 1/01 (2006.01)		(71) 출원인 인하대학교 산학협력단 인천광역시 남구 인하로 100, 인하대학교 (용현동)
(21) 출원번호 10-2011-0021004		(72) 발명자 이재화 경상남도 김해시 장유면 율하3로 76, 중앙하이츠 아파트 808동 1002호
(22) 출원일자 2011년03월09일 심사청구일자 2011년03월09일		이철균 서울특별시 서초구 신반포로 270, 104동 801호 (반포동, 반포자이아파트)
		이성목 부산광역시 동구 진성로47번길 16 (수정동)
		(74) 대리인 특허법인 천지

전체 청구항 수 : 총 3 항

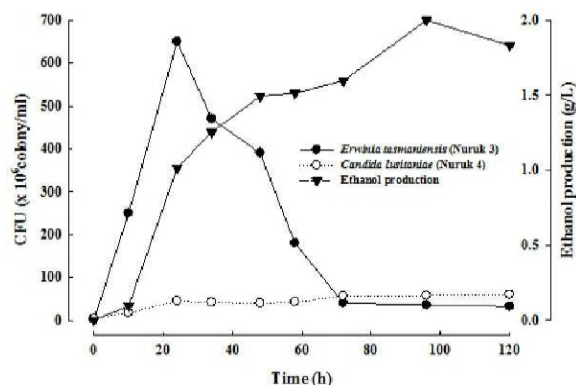
(54) 발명의 명칭 미생물을 이용한 바이오 에탄올 생산방법

(57) 요약

본 발명은 다시마 및 만니톨로 이루어진 균 중에서 선택된 1종 이상으로부터 에탄올을 생성할 수 있는 균주인 칸디다 루시타니에 LJH4 균주(*Candida lusitanae* LJH4) 및 알긴산 분해능이 있고, 다시마로부터 에탄올을 생성할 수 있는 균주인 위니아 타스메니엔시스 LJH3 균주(*Erwinia tasmaniensis* LJH3)를 혐기성 조건에서 다시마와 반응시키는 단계를 포함하는 바이오에탄올 생산방법을 제공한다.

상기 칸디다 루시타니에 LJH4 균주는 다른 균주에 비하여 해조류 특히, 만니톨이 포함되어 있는 다시마나 만니톨로부터 현저하게 우수한 수율로 에탄올을 생성할 수 있고, 세포성장도 우수하며, 상기 위니아 타스메니엔시스 LJH3 균주는 호기성 균주로, 에탄올 생성량이 높지는 않으나, 상기 칸디다 루시타니에 LJH4 균주와 함께 배양함으로써, 에탄올 생성량 및 에탄올 생성속도를 개선시킬 수 있으므로, 상기 위니아 타스메니엔시스 LJH3 균주와 상기 칸디다 루시타니에 LJH4 균주를 함께 이용하는 경우, 상기 칸디다 루시타니에 LJH4 균주만을 이용하는 경우에 비하여 짧은 시간 내에서도 에탄올 생산량을 증가시킬 수 있어서, 에탄올 생산량 증가 및 생산시간의 단축으로 인한 공정상의 경제적 효과가 매우 우수할 것으로 기대된다.

대표도 - 도8



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	20090267
부처명	국토해양부
연구사업명	해양생명공학사업
연구과제명	해양바이오에너지 생산기술개발
주관기관	인하대학교 산학협력단
연구기간	2009.11.07 ~ 2019.06.30

특허청구의 범위

청구항 1

다시마 및 만니톨로 이루어진 균 중에서 선택된 1종 이상으로부터 에탄올을 생성할 수 있는 칸디다 루시타니에 LJH4 균주 KCTC 11817BP(*Candida lusitaniae* LJH4 KCTC 11817BP), 상기 칸디다 루시타니에 LJH4 균주 KCTC 11817BP의 배양액 및 상기 배양액의 농축액으로 이루어진 균에서 선택된 1종 이상을 포함하는 생촉매와 알긴산 분해능이 있고, 다시마로부터 에탄올을 생성할 수 있는 에르위니아 타스메니엔시스 LJH3 균주 KCTC 11843BP(*Erwinia tasmaniensis* LJH3 KCTC 11843BP), 상기 에르위니아 타스메니엔시스 LJH3 균주 KCTC 11843BP의 배양액 및 상기 배양액의 농축액을 이루어진 균에서 선택된 1종 이상을 포함하는 생촉매를 혐기성 조건에서 갈조류와 반응시키는 단계를 포함하는 바이오 에탄올의 생산방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 다시마 및 만니톨로 이루어진 균 중에서 선택된 1종 이상으로부터 에탄올을 생성할 수 있는 칸디다 루시타니에 LJH4 균주 KCTC 11817BP는 서열번호 6의 염기서열을 갖는 것이고, 상기 알긴산 분해능이 있고, 다시마로부터 에탄올을 생성할 수 있는 에르위니아 타스메니엔시스 LJH3 균주 KCTC 11843BP는 서열번호 3의 염기서열을 갖는 것인 바이오 에탄올의 생산방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 갈조류는 다시마인 바이오 에탄올의 생산방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 미생물을 이용한 바이오에탄올 생산방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 현재 전세계 에너지 수요의 약 80%를 차지하고 있는 화석연료는 화석연료의 매장량이 한정되어 있어서 에너지 안보의 문제가 있고, 화석연료를 연소할 때에 발생하는 이산화탄소 등 온실가스의 배출로 인하여 지구온난화 등 기후 변화의 위협이라는 환경적인 문제를 포함한 다양한 문제를 유발시켜, 전세계적으로 화석연료의 사용량을 감축하기 위한 논의가 활발하게 이루어지고 있다.

[0003] 이에 따라 화석연료를 대신하여 사용할 대체연료의 개발이 시급한 상황이며, 이러한 대체연료로 언급되는 것이 바이오 에너지(Bio-energy)이다.

[0004] 상기 바이오 에너지는 동물, 식물 및 미생물 등 바이오매스(biomass)로부터 만들어지는 에너지원을 의미하며, 바이오매스 에너지라고도 한다. 상기 바이오매스를 에너지원으로 이용하는 방법에 있어서, 과거에는 직접 연소와 같은 방법을 주로 이용하였으나, 오늘날에는 유기물 또는 유기성 폐기물을 효소나 미생물을 이용한 생화학적 변환 공정; 광합성 미생물을 이용한 광생물학적 변환 공정; 및 열에너지와 화학적 촉매를 이용한 열화학적 변환 공정 등을 통하여 에탄올, 메탄올, 바이오 디젤, 피셔-트롭스크(Fischer-Tropsch) 디젤 등과 같은 액체 연료 및 /또는 수소, 메탄 등과 같은 기체 연료를 생산하는 방법에 대한 연구가 진행되고 있다. 최근 바이오매스로부터 얻어진 에너지원 즉, 바이오매스 에너지원은 저장 및 재생이 가능하고, 환경문제를 발생하지 않는다는 점에서 새로운 에너지원으로 그 연구의 필요성이 증대되고 있는 실정이다.

[0005] 이러한 연구의 필요성에 따라서, 최근 전 세계적으로 화석연료를 대체하기 위한 연구가 진행되고 있으며, 생체 고분자 물질인 상기 바이오매스의 효율적인 가수분해 및 연료물질로의 전환을 위해 다양한 방법이 연구되고 있다.

[0006] 기존 바이오매스 에너지원에 대한 연구는 식물류의 오일을 사용하거나 목질계 바이오매스를 바이오 에너지로 전

환하는 연구가 주를 이루었으나, 이는 상업적 규모로 적용되기 어렵다는 단점이 있을 뿐만 아니라, 세계 식량 부족의 문제 등과 관련하여 식물을 대체연료로 사용되기 어렵다는 문제점이 지적되었다.

- [0007] 이에 따라, 식량 문제와 연관된 육상 식물 또는 목질계 바이오매스를 이용하는 방법 이외에 화석연료를 대체할 수 있는 대체연료에 대한 개발이 시급한 상황이며, 이러한 문제를 해결하기 위하여, 목질계 바이오매스가 아닌 해양에 존재하는 해양식물 등을 이용한 바이오 에너지원, 구체적으로 미생물을 이용하여 해양식물로부터 수소나 메탄 등과 같은 바이오가스나 바이오에탄올과 같은 바이오 에너지를 생산하기 위한 연구에 대한 관심이 고조되고 있다.
- [0008] 이와 관련하여 최근 관심이 집중되고 있는 분야 중에 하나가 에탄올 발효를 이용한 바이오 에탄올의 생성에 관한 연구이다.
- [0009] 발효는 기원 전부터 시작된 기술이나, 1866년에 이르러서야 파스퇴르(Pasteur)의 연구 결과로부터 과학적으로 분석되고 산업적으로 개발되게 되었다. 전통적으로 에탄올 발효란 과당과 같은 당분이 효모와 같은 미생물에 의하여 이산화탄소와 에탄올로 분해하여 이루어지는 발효를 의미한다. 상기 에탄올 발효를 이용하여 전분질로부터 에탄올을 제조하기 위한 공정은 종래부터 산업적으로 이용되어 왔다.
- [0010] 특히, 바이오 에탄올은 연료용, 음료용으로 사용될 뿐만 아니라, 의약품, 화장품 및 공업용 원료 등의 많은 용도로 사용되고 있어, 해마다 그 제조량이 증가되고 있다. 이 때문에 보다 값싸고 생산성이 높은 에탄올 제조 기술의 개발이 요구되고 있다.
- [0011] 이와 관련하여, 최근에는 갈조류나 홍조류와 같은 해조류를 이용한 바이오에탄올 생산에 관한 연구가 진행되고 있다. 해조류의 경우에는 탄수화물의 구성성분비가 높고, 육상생물과 달리 식량으로 이용되는 등 식용으로 이용되는 비율이 낮아 바이오매스 즉, 바이오에탄올 생산에 바람직한 것으로 평가된다. 그러나, 해조류 특히, 갈조류의 경우 육상 생물에 비하여 에탄올 생성능 즉, 전환율이 낮은 단점이 있다.
- [0012] 우리나라는 3면이 바다로, 우리나라 인근해에서는 다양한 해조류가 풍부하게 생산되고 있다. 이러한 해조류는 우리나라에 풍부한 수산자원이나, 현재로서는 그 활용정도가 미비하며, 오히려 폐기물로 분류되는 경우도 있으므로, 상기 해조류의 이용측면에서도 해조류로부터 에탄올을 생성할 수 있는 신규한 미생물에 대한 연구의 필요성이 증가되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0013] 상기 종래기술의 문제점을 해결하기 위하여, 본 발명은 미생물을 이용하여 해조류로부터 바이오에탄올을 생성할 수 있는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0014] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 미생물을 이용하여 갈조류, 바람직하게는 다시마로부터 바이오에탄올을 생성하는 방법을 제공한다.
- [0015] 본 발명자들은 대한민국 부산지역 막걸리 제조장에서 입수한 누룩으로부터 분리되고, 다시마 및 만니톨로 이루어진 균 중에서 선택된 1종 이상으로부터 에탄올을 생성할 수 있으며, 혐기성 조건에서 다른 균주에 비하여 갈조류, 보다 구체적으로 다시마로부터 우수한 활성으로 에탄올을 생성할 수 있는 균주(LJH4)를 선별하였고, 상기 다시마로부터 우수한 활성으로 에탄올을 생성할 수 있는 LJH4 균주와 상기 누룩으로부터 분리되고, 알긴산 분해능이 뛰어나며, 다시마로부터 에탄올을 생성할 수 있는 균주(LJH3)를 함께 다시마에 반응시키는 경우, 단시간 내에 우수한 효율로 바이오 에탄올을 생산할 수 있다는 것을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.
- [0016] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0017] 본 발명에 있어서, 갈조류(brown algae)란 식물분류계의 일 군인 갈조강의 일반적 명칭을 의미한다. 상기 갈조류에 해당하는 대표적인 해조류로는 미역, 다시마, 녹미채, 대황, 톳 또는 감태 등이 있다. 상기 갈조류는 주요 광합성색소인 엽록소 a와 엽록소 c 및 갈조소가 있어서, 광합성작용으로 만니톨과 라미나란을 생성 및 저장할 수 있다. 상기 갈조류는 알긴산(alginate), 라미나란(laminaran) 또는 만니톨(mannitol) 등과 같은 탄수화물(carbohydrate)이 건조 중량을 기준으로 약 67% 정도 있으나, 가수분해에 이바지할 수 있는 리그닌(lignin)이 없고, 당의 종류가 다양하여 에탄올 생성의 측면에서 제한이 될 수 있다.

- [0018] 상기 갈조류는 주로 사람이 많이 이용하는데, 식용으로 미역, 다시마, 톳 등이 주로 사용되고, 알긴산원료로는 감태(Ecklonia) 또는 대황(Eisenia) 등이 사용된다. 상기 식용으로 사용되는 갈조류는 주로 한랭해의 것이 많지만, 미역과 같이 한랭해와 온난해 양쪽 모두에 분포되는 것도 있다. 상기 갈조류의 세포막은 독특한 다당류인 알긴산으로 만들어지지만, 계절에 따라 라미나란과 같은 β -글루칸계의 다당류를 축적해 두는 것도 있다. 또한, 만니톨과 같은 당알코올을 다량으로 함유하기 때문에 건조시 표면에 회계 분상으로 석출된다.
- [0019] 본 발명에 있어서, 다시마란 갈조식물 다시마목 다시마과 다시마속(*Laminaria* sp)에 속하는 해조류를 의미한다. 산지에 따라 용도가 약간 다르며, 다시마에 풍부한 글루탐산이나 만니톨은 다시마의 국물맛과 관계가 있다. 통상적으로 길이가 1.5 m 내지 3.5 m, 너비가 25 cm 내지 40 cm까지 자라는 큰 바닷말로, 2년 내지 4년생인 엽체는 포자세대로서, 겉보기에는 줄기, 잎 및 뿌리의 구분이 뚜렷하다. 주로, 한 대나 아한대의 연안에 분포하는 한해성 식물로, 우리나라에서는 동해안 북부, 원산 이북의 함경도 일대에서 분포하고, 이 밖에 일북 홋카이도 지방, 캄차카 반도 또는 사할린 섬 등의 태평양 북부 연안에도 분포한다. 상기 다시마 속 식물은 태평양 연안에 20여 종이 자라고 있으며, 주요 종으로는 참다시마(*L. japonica*), 오토츠크다시마(*L. ochotensis*), 애기다시마(*L. religiosa*)등이 있다. 상기 다시마는 옛날부터 한국을 비롯하여 일본 및 중국에서 식용해왔다.
- [0020] 상기 다시마에는 카로틴류, 크산토펜류 또는 엽록소 등의 여러 가지 색소 외에 탄소동화작용으로 만들어지는 마니트 또는 라미나란 등의 탄수화물과 세포벽의 성분인 알긴산이 많이 들어 있고, 요오드, 비타민 B2 또는 글루탐산 등의 아미노산이 들어 있다. 특히, 요오드, 칼륨 또는 칼슘 등 무기염류가 많이 들어 있으므로, 다시마를 조금씩 자주 먹는 것은 무기염류의 공급을 위해서 좋으며, 다시마에 들어 있는 라미닌이라는 아미노산은 혈압을 낮추는 효과가 있는 것으로 알려져 있다.
- [0021] 본 발명에 있어서, 만니톨($C_6H_{14}O_6$)이란 핵소오스에서 유래하는 당알코올의 일종 즉, 핵시톨의 일종으로 만닛트(mannite)라고도 한다. 상기 만니톨 중 D-만니톨은 D-소르비톨 또는 들시톨(dulcitol)과 유사한 대표적인 당알코올로 D-만노오스 또는 D-프룩토오스의 환원체이다. 상기 만니톨은 만나물푸레나무(*Fraxinum Ornu*), 플라타너스(*Platanusorientallis*), 양파, 꽃감, 해조류, 균류 또는 버섯류 등에 유리상태로 존재한다. 상기 만니톨은 분자량이 182.2이고, 융점이 168℃ 정되며, 비 흡습성의 침상결정이다. 상기 만니톨은 다시마 등의 일부 갈조류에 약 20% 전후로 포함되어 있고, 상기 다시마로부터 열 에탄올 추출에 의해서도 얻어 질 수 있다. 또한, 꽃감이나 건조 다시마의 표면에 흰 가루 형태로 볼 수 있다. 상기 만니톨은 수용성이고, 단맛은 설탕의 약 1/2이나, 고등동물에서는 거의 이용되지 않기 때문에 당뇨병환자의 감미료로서 이용되며, 식품에서 껌이나 엿의 점착방지제로 이용되기도 하고, 삼투압이노제 등의 의약품에도 많이 이용된다.
- [0022] 본 발명에 있어서, 누룩(nurug)은 한국의 전통주인 막걸리와 같은 술을 제조하기 위해 사용되는 것으로, 술을 만드는 효소를 갖는 곰팡이를 곡류에 번식시켜 제조한다. 보다 구체적으로, 쌀, 보리, 대두 또는 밀 등의 곡류를 원료로 하여 누룩곰팡이(*Aspergillus oryzae*) 또는 흑누룩곰팡이(*Aspergillus awamori* 혹은 *Aspergillus saitoi*)를 배양하여 제조한 것으로, 상기 누룩곰팡이는 빗갈에 따라 황국균, 흑국균 또는 홍국균 등이 있으며, 막걸리나 약주에 쓰이는 것은 주로 황국균이다. 상기 누룩곰팡이 또는 흑누룩곰팡이가 배양되면, 상기 배양물 중에 분비되는 각종 가수분해효소, 구체적으로 아밀레이즈(amylase)나 프로테아제(protease) 등의 효소들에 의해 원료 곡식 중의 전분이나 단백질 등의 고분자화합물이 저분자화되면서, 다양한 향과 맛을 나타내게 된다. 일반적으로, 상기 누룩에는 상기 누룩곰팡이 외에, 효모나 털곰팡 등이 번식되기도 한다.
- [0023] 본 발명에 있어서, 생촉매(biocatalyst)란 여러 가지 화학반응 또는 생화학반응에서 촉매의 역할을 하는 미생물 또는 미생물이 분비하는 물질을 포함하는 것일 수 있고, 일 예로 화학반응 또는 생화학반응을 촉매하는 단백질인 효소(enzyme)를 포함하는 것일 수 있다.
- [0024] 본 발명에 있어서, 균주의 배양액이란 미생물을 배양하여 얻어진 배양배지를 의미하며, 상기 균주가 포함되어 있는 배양배지 또는 상기 균체를 제거한(cell-free) 무세포 배양배지일 수 있다. 상기 배양배지이란 미생물이나 동식물의 조직을 배양하기 위하여 배양체가 필요로 하는 영양물질을 주성분으로 포함하거나, 특수한 목적을 위하여 상기 주성분 외에 추가적인 물질을 더욱 포함하는 것을 의미한다. 상기 배양배지는 미생물이나 동식물의 조직을 배양하기 위한 통상의 배지일 수 있으며, 일 예로 무기염 한천배지일 수 있다.
- [0025] 본 발명에 있어서, 배양액의 농축액이란 상기 균주의 배양액을 통상적인 방법으로 하여 농축한 것을 의미한다.
- [0026] 본 발명은 상기 다시마 및 만니톨로 이루어진 균 중에서 선택된 1종 이상으로부터 에탄올을 생성할 수 있는 균주, 상기 균주의 배양액 및 상기 배양액의 농축액으로 이루어진 균에서 선택된 1종 이상을 포함하는 생촉매 및 알긴산 분해능이 있고, 다시마로부터 에탄올을 생성할 수 있는 균주, 상기 균주의 배양액 및 상기 배양액의 농

축액으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 생촉매를 갈조류와 반응시키는 단계를 포함하는 바이오 에탄올 생산방법을 제공한다.

- [0027] 상기 다시마 및 만니톨로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상으로부터 에탄올을 생성할 수 있는 군주의 배양액은 바람직하게는 칸디다 루시타니에 LJH4 군주(KCTC 11817BP)를 배양하여 얻어진 배양배지를 의미하며, 상기 배양배지는 상기 칸디다 루시타니에 LJH4 군주가 포함되어 있는 배양배지 또는 상기 칸디다 루시타니에 LJH4 군주의 균체를 제거한(cell-free) 무세포 배양배지일 수 있다.
- [0028] 상기 알긴산 분해능이 있고, 다시마로부터 에탄올을 생성할 수 있는 군주의 배양액은 바람직하게는 위니아 타스메니엔시스 LJH3 군주(KCTC 11843BP)를 배양하여 얻어진 배양배지를 의미하며, 상기 배양배지는 상기 위니아 타스메니엔시스 LJH3 군주가 포함되어 있는 배양배지 또는 상기위니아 타스메니엔시스 LJH3 군주의 균체를 제거한(cell-free) 무세포 배양배지일 수 있다.
- [0029] 상기 다시마 및 만니톨로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상으로부터 에탄올을 생성할 수 있는 군주의 생촉매는 바람직하게는 상기 다시마 및 만니톨로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상으로부터 에탄올을 생성할 수 있는 군주일 수 있다.
- [0030] 또한, 상기 알긴산 분해능이 있고, 다시마로부터 에탄올을 생성할 수 있는 군주의 생촉매는 바람직하게는 상기 알긴산 분해능이 있고, 다시마로부터 에탄올을 생성할 수 있는 군주일 수 있다.
- [0031] 상기 다시마 및 만니톨로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상으로부터 에탄올을 생성할 수 있는 군주는 다시마 및 만니톨로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상으로부터 에탄올을 생성할 수 있는 칸디다 루시타니에 LJH4 군주(*Candida lusitaniae* LJH4)일 수 있다.
- [0032] 상기 칸디다 루시타니에 LJH4 군주는 대한민국 부산지역 막걸리 제조장에서 입수한 누룩으로부터 분리된 것으로, 다시마 및 만니톨로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상으로부터 에탄올을 생성할 수 있으며, 호기적 조건에 비하여 혐기적 조건에서 현저하게 우수한 에탄올 생성능을 가지고, 18S rDNA 염기서열 분석결과 상기 도 2b 및 서열번호 6의 서열을 갖는 군주이다. 본 발명의 선별된 군주인 LJH4 군주는 도 3b에 나타낸 바와 같이, 칸디다 루시타니에 AF172262(*Candida lusitaniae* AF172262)와 높은 상동성을 나타내었으므로, 상기 LJH4 군주는 칸디다 루시타니에 AF172262(*Candida lusitaniae* AF172262) 군주로 최종 동정되었고, 상기 LJH4 군주를 칸디다 루시타니에 LJH4(*Candida lusitaniae* LJH4) 군주로 명명하였다.
- [0033] 상기 칸디다 루시타니에 LJH4 군주(*Candida lusitaniae* LJH4)로 명명된 본 발명의 군주는 대한민국 대전광역시 유성구 과학로 111번지 한국생명공학연구원(KRIBB)에 위치한 한국생명공학연구원 생물자원센터에 2010년 12월 10일자로 기탁하여 기탁번호 KCTC 11817BP를 부여받았다.
- [0034] 상기 칸디다 루시타니에 LJH4 군주는 만니톨(mannitol), 알긴산(alginate) 및 라미나란(laminaran)을 이용할 수 있으며, 상기 칸디다 루시타니에 LJH4 군주의 당대사능과 관련하여, 만니톨에 대한 당이용능이 가장 우수하고, 다시마 분쇄물이 첨가된 배지 즉, 다시마를 이용하여 기존 군주에 비하여 매우 우수한 효율로 에탄올을 생성하고, 만니톨로부터도 우수한 효율로 에탄올을 생성할 수 있는 것으로 확인되었다.
- [0035] 상기 알긴산 분해능이 있고, 다시마로부터 에탄올을 생성할 수 있는 군주는 알긴산 분해능이 있고, 다시마로부터 에탄올을 생성할 수 있는 호기성 군주인 에르위니아 타스메니엔시스 LJH3 군주(*Erwinia tasmaniensis* LJH3)일 수 있다.
- [0036] 상기 위니아 타스메니엔시스 LJH3 군주는 대한민국 부산지역 막걸리 제조장에서 입수한 누룩으로부터 분리된 것으로, 다시마로부터 에탄올을 생성할 수 있으며, 혐기적 조건에 비하여 호기적 조건에서 우수한 에탄올 생성능을 가지고, 16S rDNA 염기서열 분석결과 상기 도 2a 및 서열번호 3의 서열을 갖는 군주이다. 본 발명의 선별된 군주인 LJH3 군주는 도 3a에 나타낸 바와 같이, 위니아 속 ABB Jeju EU434702(*Erwinia* sp ABB Jeju EU434702)와 높은 상동성을 나타내었으므로, 상기 LJH4 군주는 위니아 타스메니엔시스(*Erwinia tasmaniensis*) 군주로 최종 동정되었고, 상기 LJH3 군주를 위니아 타스메니엔시스 LJH3(*Erwinia tasmaniensis* LJH3) 군주로 명명하였다.
- [0037] 상기 칸디다 위니아 타스메니엔시스 LJH3 군주(*Erwinia tasmaniensis* LJH3)로 명명된 본 발명의 군주는 대한민국 대전광역시 유성구 과학로 111번지 한국생명공학연구원(KRIBB)에 위치한 한국생명공학연구원 생물자원센터에 2011년 1월 18일자로 기탁하여 기탁번호 KCTC 11843BP를 부여받았다.
- [0038] 상기 칸디다 루시타니에 LJH3 군주는 당대사능과 관련하여, 알긴산(alginate) 분해능이 우수하고, 호기성 조건

및 혐기성 조건 모두에서 다시마 즉, 다시마 분쇄물로부터 에탄올을 생성할 수 있고, 다시마 분쇄물이 첨가된 배지를 이용하여 실험한 결과, 혐기적 조건에서 더 우수한 효율로 에탄올을 생성할 수 있는 것으로 확인되었다.

[0039] 상기 생산방법은 상기 다시마 및 만니톨로 이루어진 균 중에서 선택된 1종 이상으로부터 에탄올을 생성할 수 있는 균주, 구체적으로 칸디다 루시타니에 LJH4 균주 및 알긴산 분해능이 있고, 다시마로부터 에탄올을 생성할 수 있는 균주, 구체적으로 위니아 타스메니엔시스 LJH3 균주를 해조류, 바람직하게는 갈조류, 더욱 바람직하게는 다시마와 반응시키는 단계를 포함하는 것일 수 있다.

[0040] 상기 반응시키는 단계는 바람직하게는 혐기성 조건에서 수행할 수 있다.

[0041] 또한, 상기 반응시키는 단계는 20 내지 35℃, 바람직하게는 25 내지 33℃에서 수행할 수 있고, 더욱 바람직하게는 27 내지 32℃에서 수행할 수 있다.

[0042] 상기 칸디다 루시타니에 LJH4 균주는 다른 균주에 비하여 해조류 특히, 만니톨이 포함되어 있는 다시마나 만니톨로부터 현저하게 우수한 수율로 에탄올을 생성할 수 있고, 상기 만니톨이 포함되어 있는 다시마나 만니톨이 포함된 배지에서 세포성장도 우수하므로, 기존에 에탄올 전환율이 낮아 바이오에너지원으로 이용이 제한되었던 해조류, 구체적으로 갈조류를 이용한 바이오 에탄올 생산 효율을 개선할 수 있다. 또한, 상기 위니아 타스메니엔시스 LJH3 균주는 호기성 균주이기는 하나, 혐기적 조건에서 더 높은 에탄올 생성량을 가지고, 특히 알긴산에 대한 분해능이 있는 균주로, 상기 위니아 타스메니엔시스 LJH3 균주와 상기 칸디다 루시타니에 LJH4 균주를 함께 이용하는 경우에 에탄올 생성능이 상기 칸디다 루시타니에 LJH4 균주만을 이용하는 경우에 비하여 짧은 시간 내에서도 에탄올 생산량을 증가시킬 수 있어서, 에탄올 생산을 위한 배양시간의 단축으로 인한 공정상의 경제적 효과를 얻을 수 있는 것으로 확인되었다.

발명의 효과

[0043] 이상 살펴본 바와 같이, 본 발명에 따른 칸디다 루시타니에 LJH4 균주 및 니아 타스메니엔시스 LJH3 균주를 함께 다시마가 첨가된 배지에서 배양하는 경우, 최적 생성량을 기준으로 생성량도 약 160% 정도로 현저하게 증가 될 뿐만 아니라, 칸디다 루시타니에 LJH4 균주 단독으로 반응시킨 반응시간 보다 짧은 반응시간, 즉, 단독 반응 시간의 절반 정도의 반응시간 내에 더 우수한 수율로 에탄올을 생성할 수 있으므로, 기존에 에탄올 전환율이 낮아 바이오에너지원으로 이용이 제한되었던 해조류, 구체적으로 갈조류를 이용한 바이오 에탄올 생산 효율을 생산성 및 공정단축이란 점에서 개선할 수 있으므로, 환경 및 경제적 측면을 고려하면, 그 산업적 이용가치가 매우 크다고 할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0044] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른, 다시마 첨가가 누룩균의 에탄올 생성량에 미치는 효과를 확인하기 위하여 누룩 및 다시마가 첨가된 누룩을 발효한 경우 생성된 에탄올 발생량을 비교한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른, 본 발명의 균주의 염기서열분석 결과로, 도 2a는 다시마가 첨가된 배지에서 에탄올 생성능이 우수한 것으로 확인된 LJH4의 염기서열 즉, LJH4의 18S rDNA 염기서열분석 결과이고, 도 2b는 알긴산 분해능이 있고, 다시마가 첨가된 배지에서 에탄올을 생성할 수 있는 것으로 확인된 LJH3의 염기서열 즉, LJH3의 16S rDNA 염기서열분석 결과이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른, 본 발명의 균주의 염기서열을 기초로 한 다른 세균과의 계통발생론적 관계(Phylogenetic tree)를 나타내는 표로, 도 3a는 다시마가 첨가된 배지에서 에탄올 생성능이 우수한 것으로 확인된 LJH4 즉, LJH4의 18S rDNA 염기서열을 기초로 한 다른 세균과의 계통발생론적 관계를 나타내는 표이고, 도 3b는 알긴산 분해능이 있고, 다시마가 첨가된 배지에서 에탄올을 생성할 수 있는 것으로 확인된 LJH3 즉, LJH3의 16S rDNA 염기서열을 기초로 한 다른 세균과의 계통발생론적 관계를 나타내는 표이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른, 본 발명의 균주의 알긴산 분해능을 확인한 사진으로, 상기 사진의 1은 LJH1을 접종한 결과이고, 상기 사진의 2는 LJH2를 접종한 결과이며, 상기 사진의 3은 LJH3을 접종한 결과이고, 상기 사진의 4는 LJH4를 접종한 결과이며, 상기 사진의 붉은색 표시는 알긴산 분해 정도를 확인하여 주는 분해환의 지름을 표시한 것이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른, 다시마가 첨가된 배지에서 에탄올 생성능이 우수한 것으로 확인된 LJH4과 알긴산 분해능을 갖는 것으로 확인된 LJH3 및 누룩으로부터 분리한 다른 균주의 다시마로부터 에탄올 생성능을 확인한 그래프로, 도 5a는 혐기성 조건에서 배양한 결과이고, 도 5b는 호기성 조건에서 배양한 결과이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른, 다시마가 첨가된 배지에서 에탄올 생성능이 우수한 것으로 확인된 LJH4와 *Candida lusitanae*(KCTC 7212)의 혐기성 조건에서 탄소원에 따른 생육활성을 비교한 그래프로, 도 6a는 *Candida lusitanae*(KCTC 7212)을 배양한 결과이고, 도 6b는 다시마가 첨가된 배지에서 에탄올 생성능이 우수한 것으로 확인된 LJH4를 배양한 결과이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른, 다시마가 첨가된 배지에서 에탄올 생성능이 우수한 것으로 확인된 LJH4와 *Candida lusitanae*(KCTC 7212)의 혐기성 조건에서 탄소원에 따른 에탄올 생성능을 비교한 그래프로, 도 7a는 *Candida lusitanae*(KCTC 7212)을 배양한 결과이고, 도 7b는 다시마가 첨가된 배지에서 에탄올 생성능이 우수한 것으로 확인된 LJH4를 배양한 결과이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른, 다시마가 첨가된 배지에서 에탄올 생성능이 우수한 것으로 확인된 LJH4과 알긴산 분해능을 갖는 것으로 확인된 LJH3을 함께 혐기적 조건에서 배양한 경우, 각 균주의 생육활성 및 에탄올 생성능을 확인한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0045] 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 제한되는 것은 아니다.

[실시예]

[0047] <실시예 1> 다시마 및 만니톨로 이루어진 균 중에서 선택된 1종 이상으로부터 에탄올을 생성할 수 있는 미생물의 탐색 및 분리

[0048] 부산지역 채래시장에서 입수한 누룩에 부산지역 부전시장에서 건다시마로 판매되는 것을 구입한 다시마(*Laminaria japonica*)를 2.0%의 농도로 첨가한 시료액을 해조류, 구체적으로 다시마로부터 에탄올을 생성할 수 있는 미생물을 분리하기 위한 시료액으로 사용하였다. 상기 다시마는 볼 밀러(ball miller, DW-BM5, 동원 과학사, 대한민국)를 이용하여 분쇄한 후, 오토클레이브(autoclave)를 이용하여 121℃에서 30분간 멸균 및 추출한 후, 여과지(paper filter)로 여과한 것을 사용하였다. 상기 다시마로부터 에탄올을 생성할 수 있는 해양 미생물의 탐색 및 분리는 다음과 같은 방법으로 수행하였다.

[0049] 우선, 누룩에 다시마로부터 에탄올을 생성할 수 있는 균주가 존재하는지 여부를 확인하기 위하여, 물에 누룩을 2%(20 g/L) 함량으로 첨가한 것과 물에 누룩 2%(20 g/L) 및 상기 다시마 분쇄물 2%(20 g/L)를 첨가한 것을 각각 30℃에서 혐기조건(anaerobic condition) 또는 호기조건(aerobic condition)으로 배양하면서 불꽃이온화검출기(flame ionization detector, FID) 및 HP-FFAP 모세 컬럼(HP-FFAP capillary column, Cross-Linked PEG-TPA 30 m / 0.25 mm / 0.25 μL)이 장착된 HP 5890 가스 크로마토그래피(gas chromatography)를 이용하여 에탄올 발생량을 측정하였다. 상기 장치 및 검출기의 온도는 각각 150℃ 및 200℃로 유지하였고, 상기 가열은 45℃(2 min) / 1℃/분의 속도로 가열 / 50℃(1 min) / 20℃/분의 속도로 가열 / 90℃(1 min) / 30℃/분의 속도로 가열 / 150℃(1 min)의 조건으로 승온시키면서 / 1℃/분의 속도 조건으로 수행하였다. 상기 시간에 따른 에탄올 발생량을 측정한 결과를 도 1에 나타내었다.

[0050] 상기 도 1에서 나타난 바와 같이, 누룩만을 발효시킨 경우에 비하여, 누룩과 다시마를 함께 발효시킨 경우에서 에탄올 생성량이 월등히 높은 것으로 확인되었다. 보다 구체적으로, 누룩만을 120시간 동안 발효시킨 경우, 에탄올 농도는 0.93 g/L인 반면, 누룩과 다시마 분쇄물을 함께 120시간 동안 발효시킨 경우, 에탄올 농도는 1.87 g/L로 확인되었다. 상기 결과는 발효과정에서 다시마가 에탄올로 발효될 수 있음을 의미하며, 이는 누룩에 다시마로부터 에탄올을 생성할 수 있는 균주가 존재하는 것으로 해석될 수 있다. 또한, 발효조건에서 호기적 조건(aerobic culture)의 경우 에탄올 발효가 나타나지 아니하여, 상기 균주는 혐기적 조건에서 에탄올을 생성하는 것으로 예상되었다.

[0051] 상기 결과를 바탕으로, 다시마로부터 에탄올을 생성할 수 있는 균주를 누룩으로부터 분리하기 위하여, 다시마 분쇄물이 2% 포함된 고체배지를 이용하여 호기성 조건과 혐기성 조건에서 배양되는 균주를 분리하였다.

[0052] 보다 구체적으로, 상기 다시마 분쇄물이 2% 포함된 배지에 시료액을 도말한 후 30℃에서 배양한 후에, 상기 분리된 균주의 콜로니(colony)에서 균을 백금이를 이용하여 채취한 하였다. 상기 균을 채취한 후, 상기 다시마

분쇄물이 2% 포함된 배지와 동일한 조성의 배지에 도말하는 것을 수차례 반복하여 상기 균주들을 순수 분리하였다.

[0053] 상기 분리된 균주는 총 4종류로, 각각 LJH1, LJH2, LJH3 및 LJH4로 명명하였다. 상기 LJH1, LJH2 및 LJH3 균주의 경우, 호기성 균주로 확인된 반면, LJH4 균주의 경우 혐기성 균주로 확인되었고, 콜로니의 색깔이 흰색으로 확인되었다.

[0054] <실시예 2> 다시마 및 만니톨로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상으로부터 에탄올을 생성할 수 있는 해양 미생물의 동정

[0055] 실시예 2-1. 분리 균주의 동정

[0056] 상기 실시예 1에서 분리된 균주인 LJH1, LJH2, LJH3 및 LJH4의 동정은 16S rDNA 염기서열 또는 18S rDNA 염기서열의 분석을 통하여 수행하였다. 상기 6S rDNA 염기서열 또는 18S rDNA 염기서열의 분석은 상기 균주의 genomic DNA를 추출하여 PCR을 수행하고, 16S rDNA 유전자 염기서열 또는 18S rDNA 유전자 염기서열을 분석하여 수행하였다. 상기 PCR은 GeneAmp PCR System 2400(PerkinElmer Inc., USA)을 사용하여 수행하였다. 또한, 상기 추출한 genomic DNA로부터 16S rDNA 염기서열 또는 18S rDNA 염기서열 분석을 위해 사용한 프라이머 쌍에 대하여 표 1 및 표 2에서 각각 포워드 프라이머(Forward Primer, 27F(서열번호 1) 및 ITS1(서열번호 4))와 리버스 프라이머(Reverse Primer, 1492R(서열번호 2) 및 ITS4(서열번호 5))로 나타내었다.

표 1

Primers	서열 (5'3')	서열번호
27F	5'-AGA GTT TGA TCM[M=C:A] TGG CTC AG-3'	1
1492R	5'-TAC GGY[Y=C:T] TAC CTT GTT ACG ACT T-3'	2

표 2

Primers	서열 (5'3')	서열번호
ITS1	5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'	4
ITS4	5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'	5

[0059] 상기 PCR 산물의 염기서열을 분석은 (주)마크로젠(대한민국)에 의뢰하여 수행하였다. 16S rDNA 염기서열분석 및 18S rDNA 염기서열분석과 관련하여, 각각의 염기서열을 결정하였고, LJH3의 염기서열에 대해 총 1469 bp 염기서열(서열번호 3)을 결정하였으며, LJH4의 염기서열에 대해 총 829 bp 염기서열을 결정하였고, 그 결과로 얻은 염기서열(서열번호 6)을 도 2a 및 도 2b에 나타내었다.

[0060] 상기 분석된 균주의 16S rDNA 염기서열 및 18S rDNA 염기서열을 분석하여 상기 균주를 동정하였다. 보다 구체적으로 상기 결정된 균주의 16S rDNA 염기서열 및 18S rDNA 염기서열을 GenBank에 등록된 기존 균주에 대한 정보 및 Ribosomal Database Project(R)에 대한 정보를 대상으로 Blast program을 이용하여 상동성 검색을 실시하였고, 윈도우 버전의 Clustal 프로그램(ClustalX ver. 1.8)을 이용하여 다중염기배열(multiple alignment)을 수행한 후, neighbor-joining method와 bootstrap method(n=1000)로 분석하여 계통분류학적 위치를 파악하였다. 상기 파악된 결과를 바탕으로 계통 발생도(Phylogenetic tree)를 작성하였으며, 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0061] 도 3a에 나타낸 바와 같이, 상기 LJH3 균주는 에르위니아 퍼시시나 WD1(*Erwinia persicina* WD1) 및 에르위니아 속 ABB Jeju 1(*Erwinia* sp. ABB Jeju 1)와 높은 상동성을 나타내었으므로, 상기 LJH3 균주는 에르위니아 타스메니엔시스(*Erwinia tasmanienis*) 균주로 최종 동정되었고, 상기 LJH3 균주를 에르위니아 타스메니엔시스 LJH3(*Erwinia tasmanienis* LJH3) 균주로 명명하였다.

[0062] 상기 에르위니아 타스메니엔시스 LJH3 균주는 대한민국 대전광역시 유성구 과학로 111번지 한국생명공학연구원(KRIBB)에 위치한 한국생명공학연구원 생물자원센터에 2011년 1월 18일자로 기탁하여 기탁번호 KCTC 11843BP를 부여받았다.

[0063] 도 3b에 나타낸 바와 같이, 상기 LJH4 균주는 칸디다 루시타니에 AF172262(*Candida lusitaniae* AF172262) 및

클라비스포라 루시타니에 EF568049(*Clavispora lusitaniae* 568049)와 높은 상동성을 나타내었으므로, 상기 LJH4 균주는 칸디다 루시타니에 AF172262(*Candida lusitaniae* AF172262) 균주로 최종 동정되었고, 상기 LJH4 균주를 칸디다 루시타니에 LJH4(*Candida lusitaniae* LJH4) 균주로 명명하였다.

[0064] 상기 칸디다 루시타니에 LJH4 균주는 대한민국 대전광역시 유성구 과학로 111번지 한국생명공학연구원(KRIBB)에 위치한 한국생명공학연구원 생물자원센터에 2010년 12월 10일자로 기탁하여 기탁번호 KCTC 11817BP를 부여받았다.

[0065] 또한, 상기 LJH1 균주는 엔테로박터 속 균주(*Enterobacter* sp.)로 동정되었고, 상기 LJH2 균주는 판토에아 아글로메란스(*Pantoea agglomerans*)로 동정되었다.

[0066] 실시예 2-2. 분리 균주의 당분해능

[0067] 상기 균주의 당분해능을 확인하기 위하여, 플레이트 어세이법(Plate assay, Gacesa and Wusteman, Appl. Environ. 56(1990))을 수행하였다.

[0068] 보다 구체적으로, 상기 분리 균주의 알지네이트 즉, 알긴산 분해능을 확인하기 위하여, 0.1%(w/v)의 알긴산(SigmaAldrich Co., USA) 및 0.5% peptone이 포함된 배지에서 상기 LJH1, LJH2, LJH3 및 LJH4 균주를 상기 실시예 2-1과 같이 배양하면서 알긴산 분해능을 측정하였다. 상기 알긴산 분해능을 측정하기 위해서, 세틸피리디늄 클로라이드(cetylpyridinium chloride, USA)가 10%(w/v) 포함된 용액을 가한 후, 상온(약 20℃)에서 30분 동안 배양하면서, 분해환(clearing zone)의 생성 및 크기에 따라, 알긴산 분해능을 확인하였다. 상기 분해환을 확인하기 위해 배양한 플레이트의 사진을 도 4에 나타내었다.

[0069] 상기 도 4에 나타낸 바와 같이, LJH1, LJH2 및 LJH4 균주는 분해환이 전혀 생성되지 아니하여, 알긴산 분해능이 없는 것으로 확인되었으나, LJH3 균주의 경우 상기 분해환이 명확하게 확인되어, 알긴산 분해능이 우수한 것으로 확인되었다.

[0070] <실시예 3> 칸디다 루시타니에 LJH4 균주의 에탄올 생성능 확인

[0071] 실시예 3-1. 에탄올 생성능이 가장 우수한 균주의 확인

[0072] 상기 LJH1, LJH2, LJH3 및 LJH4 균주의 에탄올 생성능을 확인하였다. 상기 분리된 4종의 균주를 상기 실시예 1의 상기 다시마 분쇄물이 2% 포함된 배지 100 ml가 주입된 300 ml의 플라스크를 이용하여 혐기성 또는 호기성 조건에서 배양시키면서 에탄올 생성능을 확인하였다. 상기 배양조건으로 배양온도는 30℃에서 수행하였고, 배양 pH는 다시마 분쇄물의 첨가 등에 따라 변화된 pH를 염산이나 수산화나트륨을 이용하여 pH 7로 조절하여 수행하였으며, 혐기성 또는 호기성 여부를 제외하고는 다른 조건은 동일한 조건에서 수행하였다. 상기 혐기성 조건(anaerobic condition)에서 배양은 배양용기를 부틸 고무 마개(butyl rubber cover)로 막은 후, 내부 공기를 제거하여 공기의 출입을 제어하면서 배양하는 방법으로 수행하였고, 상기 호기성 조건(aerobic condition)에서 배양은 다른 균들에 의한 오염을 방지하기 위하여, 알루미늄(aluminum)으로 용기 입구를 막고 배양하는 방법으로 수행하였다.

[0073] 각각의 균주의 배양조건 및 배양시간에 따른 에탄올 생성량을 측정하여 그 결과를 도 5에 나타내었다. 도 5a는 혐기성 조건에서 배양한 결과이고, 도 5b는 호기성 조건에서 배양한 결과이다.

[0074] 상기 도 5a에 나타낸 바와 같이, 60시간이 경과하기 전까지는 호기성 균주인 LJH1, LJH2 및 LJH3 균주의 에탄올 생성능이 높았으나, 60시간이 경과한 이후에는 LJH4 균주의 에탄올 생성능이 더 우수한 것으로 확인되었고, 최대 생산량을 기준으로 비교하면, LJH4 균주의 경우, 약 1.24 g/L의 에탄올을 생산하여 에탄올 생산능이 가장 우수한 것으로 확인되었다. 호기성 균주인 LJH1, LJH2 및 LJH3 균주 중에서는 LJH2가 가장 우수하여, 약 0.81 g/L의 에탄올을 생산하는 것으로 확인되었고, 상기 생산량은 LJH4 균주의 약 60% 정도에 불과하여, 상기 LJH4 균주의 에탄올 생성능이 현저하게 우수한 것임이 확인되었다.

[0075] 상기 도 5b에 나타낸 바와 같이, 호기성 조건에서는 호기성 균주인 LJH1, LJH2 및 LJH3 균주가 혐기성 균주인 LJH4 균주 보다 에탄올 생성능이 높고, 최적 에탄올 생성도 단시간 내에 이루어졌으나, 전반적으로 에탄올 생성량이 낮은 것이 확인되었다. 구체적으로, 호기성 조건에서 가장 에탄올 생성능이 높았던 LJH3 균주의 에탄올 생성량은 약 0.39 g/L로, 혐기성 조건에서 LJH4 균주의 에탄올 생성능의 약 30% 정도인 것으로 확인되었다.

- [0076] 따라서, 상기 실시예 2에서 분리된 균주 중 LJH4 균주가 혐기성 조건에서 갈조류 즉, 다시마가 포함된 배지로부터 에탄올을 생성할 수 있는 생성능이 가장 우수한 것으로 확인되었다.
- [0077] 실시예 3-2. LJH4 균주의 활성 확인
- [0078] 상기 에탄올 생성능이 가장 우수한 것으로 확인된 칸디다 루시타니에 LJH4 균주의 에탄올 생성능을 확인하기 위하여, 같은 속에 해당하는 미생물인 *Candida lusitanae*(KCTC 7212)와 비교하여 생육 정도 및 에탄올 생성능을 확인하였다.
- [0079] 상기 균주의 배양은 혐기적 조건에서 탄소원으로 상기 다시마 분쇄물(*L. japonica*), 알긴산(alginate, Sigma-Aldrich Co., USA), 라미나란(laminaran, Tokyo Kasei, 일본) 또는 만니톨(mannitol)이 첨가된 배지를 이용하여 상기 실시예 3-1과 같은 방법으로 수행하였고, 상기 균주의 생육정도는 600 nm에서 UV/Vis 스펙트로미터 (Optizen 2120 UV, 메카시스사, 대한민국)를 이용하여, 흡광도(Absorbance, Optical density)를 측정하는 방법으로 수행하였고, 상기 균주의 에탄올 생성능은 상기 실시예 1와 같은 방법으로 수행하였다. 상기 생육정도의 측정과 관련하여, 갈조류 즉, 다시마 분쇄물을 첨가하는 경우에는 다시마 분쇄물에 의한 측정 오류가 제거되지 아니하여, 알긴산, 라미나란 또는 만니톨을 첨가한 배지에 대해서만 수행하였다.
- [0080] 상기 생육정도를 측정한 결과를 도 6에 나타내고, 에탄올 생성능에 대한 측정 결과를 도 7에 나타내었다.
- [0081] 상기 도 6에 나타난 바와 같이, 모든 기질 즉, 모든 종류의 배지에서 공지균주인 *Candida lusitanae*(KCTC 7212, 도 6a)에 비하여 칸디다 루시타니에 LJH4 균주(도 6b)의 생육정도가 더 우수한 것으로 확인되었다. 특히, 만니톨이 첨가된 배지의 경우에는 루시타니에 LJH4 균주는 *Candida lusitanae*(KCTC 7212)에 비하여 약 25% 정도 더 우수한 생육정도를 나타내었다.
- [0082] 또한, 상기 도 7에 나타난 바와 같이, 알긴산 또는 라미나란의 경우 유의적인 차이를 보이지 않았으나, 만니톨 및 다시마 분쇄물을 이용한 배지의 경우에는 현저한 에탄올 생성능의 차이가 나타났다. 상기 만니톨 및 다시마 분쇄물을 이용한 배지의 경우, *Candida lusitanae*(KCTC 7212, 도 7a)에 비하여 칸디다 루시타니에 LJH4 균주(도 7b)의 생육정도가 현저하게 우수한 것으로 확인되었다. 상기 만니톨이 포함된 배지의 경우, 최고 생산량 즉, 최고 에탄올 농도(maximum ethanol concentration)를 기준으로, 칸디다 루시타니에 LJH4 균주(2.59 g/L)는 *Candida lusitanae*(KCTC 7212) 생산량의 약 300% 이상에 달하고, 상기 다시마 분쇄물이 포함된 배지의 경우 최고 에탄올 농도를 기준으로, 칸디다 루시타니에 LJH4 균주는 *Candida lusitanae*(KCTC 7212) 생산량의 약 700%에 달하는 생산량을 생산하여, 상기 칸디다 루시타니에 LJH4 균주(약 1.3 g/L)는 *Candida lusitanae*(KCTC 7212)에 비하여 혐기성 조건에서 다시마 분쇄물 또는 만니톨이 포함된 배지에서의 에탄올 생산량이 현저하게 우수한 것으로 확인되었다.
- [0083] **<실시예 4> 균주 조합 사용에 의한 에탄올 생성 최적 조건 확인**
- [0084] 상기 실시예 2-2에서 알긴산 분해능이 우수한 것으로 확인된 LJH3 균주는 갈조류, 구체적으로 다시마의 알긴산을 분해하여 상기 실시예 3에서 에탄올 생성능이 가장 우수한 것으로 확인된 LJH4 균주의 에탄올 생성에 도움 즉, 상기 LJH4 균주가 보다 빠른 시간 내에 에탄올을 생성할 수 있도록 도움이 될 것으로 예상되어, 상기 LJH3 균주 및 상기 LJH4 균주를 상기 실시예 3-2와 같은 방법으로 배양하면서, 균주의 성장정도 및 에탄올 발생정도를 측정하였다. 상기 측정결과를 도 8에 나타내었다.
- [0085] 상기 도 8에 나타난 바와 같이, 상기 LJH3 균주는 배양 초기에 균체가 급격히 증가하였고, 24시간이 경과한 후부터는 균체가 감소하였으나, 상기 LJH4 균주는 균체수가 제한적으로 증가되기는 하였으나, 꾸준히 증가하는 것으로 확인되었으며, 그 결과 약 72시간이 경과한 후부터는 상기 LJH3 균주에 비하여 상기 LJH4 균주가 더 많아지는 것(dominant microorganism)으로 확인되었다. 또한, 상기 시점부터 에탄올 생성량도 다시 증가량이 증가되는 것으로 확인되었다.
- [0086] 상기 LJH3 균주 및 상기 LJH4 균주를 함께 배양한 경우, 최대 에탄올 생산량은 약 2.0 g/L의 에탄올을 생산하여 상기 LJH3 균주는 물론 상기 LJH4 균주에 비해서도 약 60% 이상의 에탄올 생성능 증가 즉, 상기 LJH4 균주 생산량의 약 160.9%로의 생성능 증가가 확인되어, 에탄올 생산능이 현저하게 개선되는 것으로 확인되었다. 또한, 약 48시간 동안만 반응시키는 경우에도 상기 LJH4 균주만을 반응시킨 경우, 96시간 동안 반응시킨 최적 생산량인 약 1.24 g/L보다 높은 에탄올이 생산되는 것으로 확인되어, 반응시간도 단축시킬 수 있는 것으로

확인되었다.

- [0087] 이상 살펴본 바와 같이, 본 발명에 따른 칸디다 루시타니에 LJH4 균주 및 에르위니아 타스메니엔시스 LJH3 균주를 함께 다시마가 첨가된 배지에서 배양하는 경우, 에탄올 생성량이 현저히 증가되고, 짧은 반응시간 내에도 우수한 수율로 에탄올을 생성할 수 있으므로, 기존에 에탄올 전환율이 낮아 바이오에너지원으로 이용이 제한되었던 해조류, 구체적으로 갈조류를 이용한 바이오 에탄올 생산 효율을 생산성 및 공정단축이란 점에서 개선할 수 있으므로, 환경 및 경제적 측면을 고려하면, 그 산업적 이용가치가 매우 클 것으로 예상된다.

수탁번호

[0088]

기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC11843BP

수탁일자 : 20110105

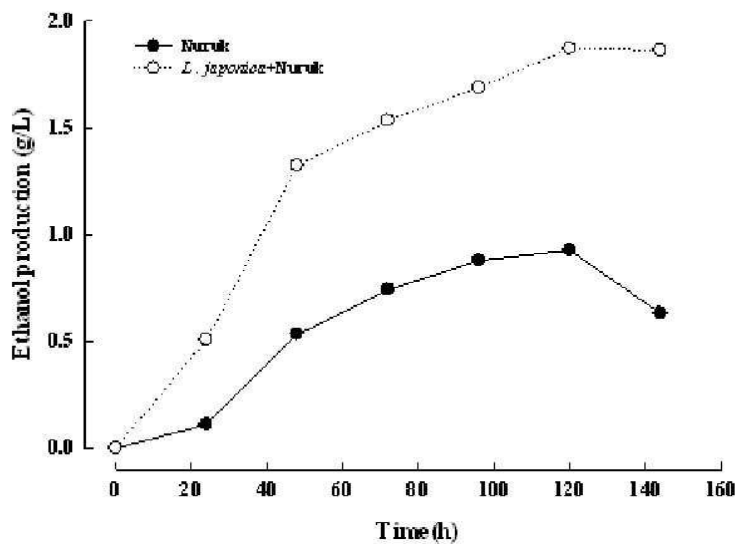
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC11817BP

수탁일자 : 20101130

도면

도면1



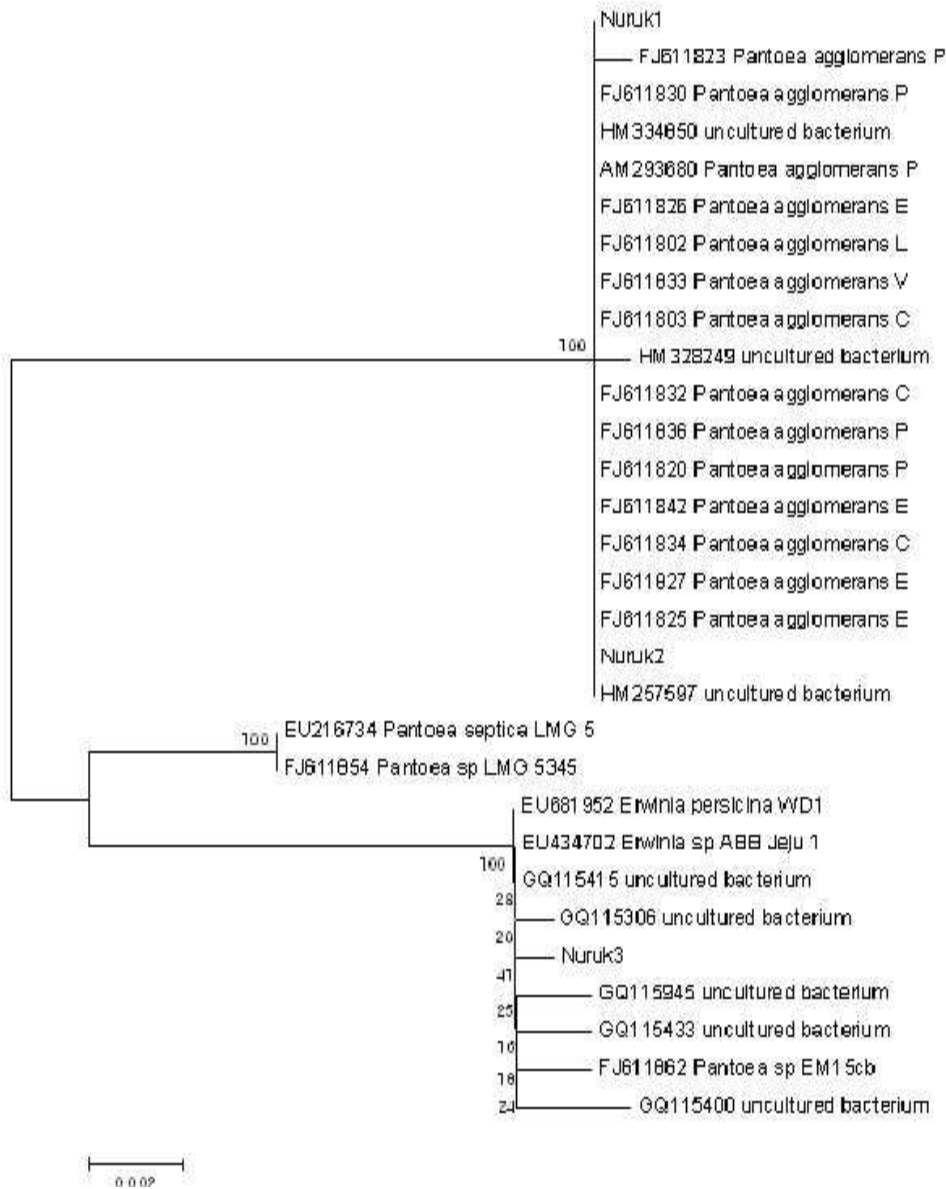
도면2a

AGATTGAACGCTGGGGCAGGGCTAACACATGCAAGTCGAACCGTAGCACAGAGAACTTGCTTCTTGGG
 TGACGAGTGGCGGAOEGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCGCGATGGAGGGGATAACTACTGGAAACGG
 TAGCTAATACCGCATAACTCTTCGGACCAAAGTGGGGGACCTTCGGGGCTCACGCCATCGGATGTGCC
 AGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGTAAOEGGTCAOCTAGGCGAGGATOCCTAGCTGGTCTGAGAGGATG
 ACCAGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTOCTAOGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAAT
 GGGCGCAAGCGTGAATGCAGOCATGCGCGTGTATGAAGAAGGOCCTTCGGTTGTAAAGTACTTTGAGCGG
 GGAGGAAGGGGATGCGTTAATAACCGCGTGGATTGACGTTAOCGGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCGG
 TGCCAGCAGCGCGGTAAATACGGAGGGTGCAAGGCTTAATOGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCGAG
 CGGTCTGTCAAGTCAGATGTGAAATCCCGGGCTTAACCTGGGAACTGCATTTGAACTGGCAGGCTAGA
 GTCTTGTAGAGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGGGTAGAGATCTOGAGGAATACCGGTGG
 CGAAGCGGGCGCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGAGCAACAGGATTAGATAC
 CCTGGTAGTCCAGCGCTAAACGATCTCGACTTGAGCGCTGTTCCTTGACGAGTGGCTTCGGAGCTAA
 CGGTTAAGTCAGCGCGCTGGGAGTACCGCGCAAGCTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGCGCGCA
 CAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAAGCGAAGAAGCTTACCTGGCCTTGACATCCACAGAA
 TTCAGCAGAGATGCCCTAGTGCCCTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCTGACCTGGTGT
 TGTGAAATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTATCCTTTGTTCGACGATTCCGTGGGA
 ACTCAAAGGAGACTGCGGTGATAAAOEGGAGGAGGTGGGGATGAAGTCAAGTCAATCATGGCCCTTA
 CGGCCAGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAAAGAGAAGGGAAGTGGCAGAGCAAGCGGACCT
 CATAAAGTGGGTGCTAGTCCGGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCGGTGAAGTGGGAATGGCTAGTAATCG
 TGGATCAGAAATGCCAGGTGAATAGCTTCCGGGGCTTGTACACAACGCGCTCACACCATGGGGAGTGG
 GGTTCGAAAAAGATAGTACGTTAAOCCCTCGGAGGGCGCTTAOCACTTTGTGATCATGACTGGGT

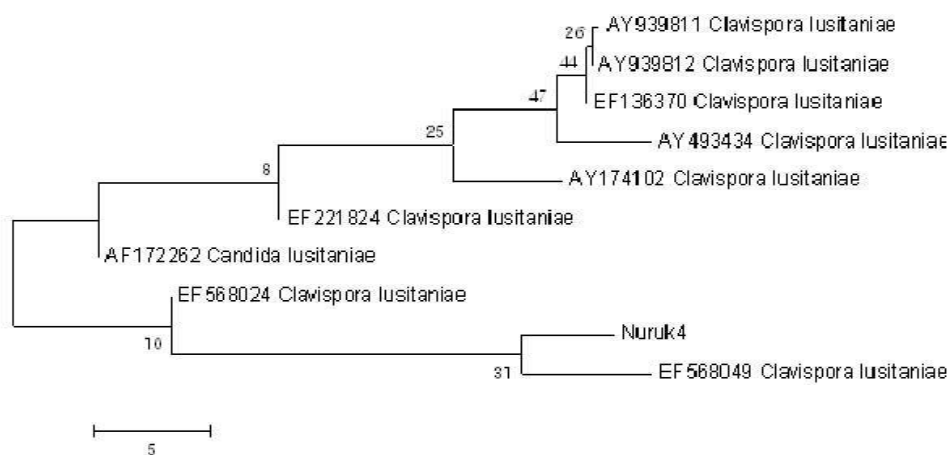
도면2b

AACCTGGGAAGGATCATTAATAATACATTACACATTTGTTTTTGGGAACAAAAATAAAA
 TTTTTTTATTOGAATTTCTTAATATCAAACTTTCAACAACCGATCTCTTGGTTCTGGCA
 TOGATGAAGAAGCGAGCGAAITTOGATACGTAGTATGACTTGCAGACGTGAATCATOGAA
 TCTTTGAACGCACATTOGGGCTOGAGGCATTCTOGAGGCATGCCGTGTTGAGCGTCCCA
 TOCCCTCTAAOCCCGGTTAGGGGTTGCTTCGAAATATCAACGGGCTGTCAAACAGGTT
 TACAGCAOGACATTTGGCCCTCAAATCAGGTAGGACTAOCCTGAACTTAAGCATAICA
 ATAGTOGGAGGAAAAGGATCATTAATAATACATTACACATTTGTTTTTGGGAACAAAA
 ATAAATTTTTTATTOGAATTTCTTAATATCAAACTTTCAACAACCGATCTCTTGGTTCT
 TOGCATOGATAAGAAGCGACCGAATTOGATACGTAGTATGACTTGCAGACGTGAATCATOG
 AATCTTTGAACGCACATTTGGGCTCGAGGCATTTGNGAGGCATGCTGTTTNGAGGNNCC
 CACCCCTCTAAOCCCGGTTANGONTTCTTOCCAAATATCACNGGGTTTTTCAAAAANTTT
 TTINGNAAGAGATTTGTTCOCCOCCNNAANGGGGGGACACCCOCCNAAATANAAAAAN
 TTTTTGGGGGGGAAAAAGAAACCTNNTTAATCTGANTTNNAAGCCGNGGAAATAATNT
 GANCTTTCACATTTCTNTAAOCCCTNCINAACNTGTTCCNTNGATTNGGAN

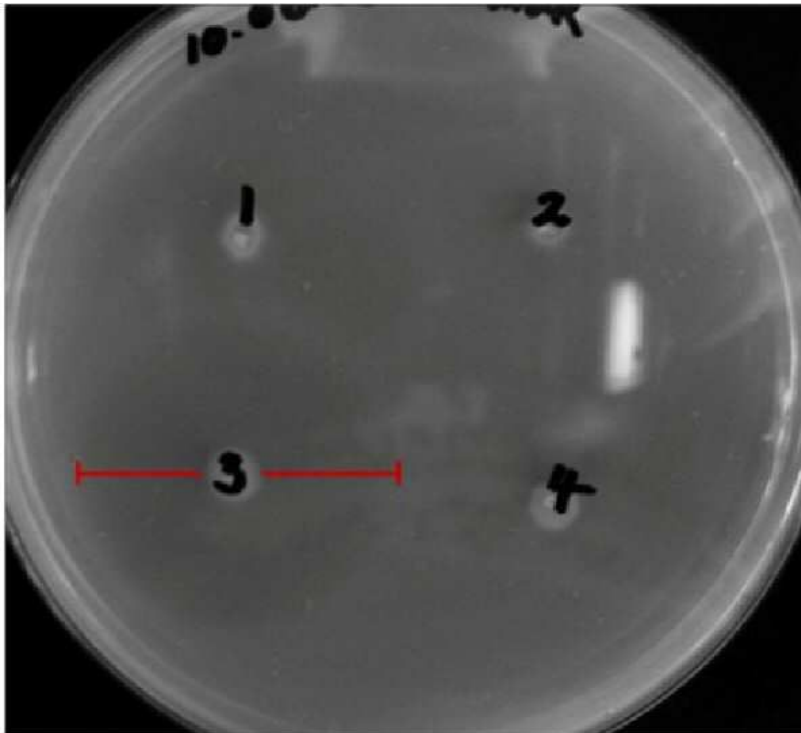
도면3a



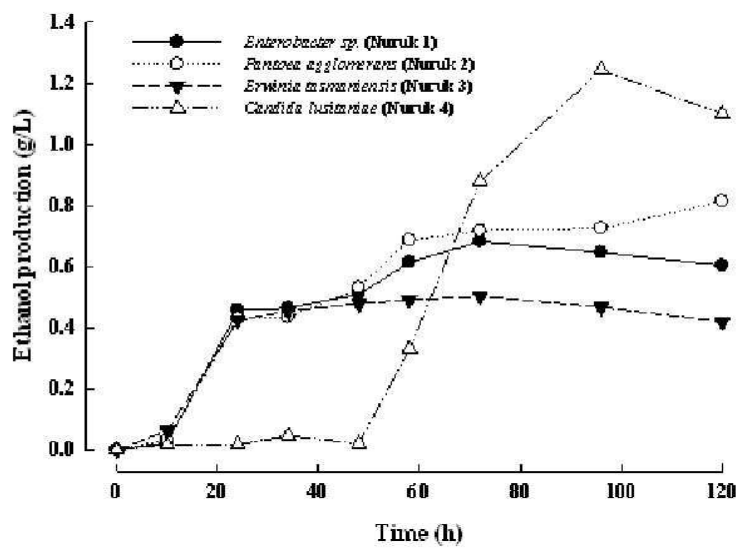
도면3b



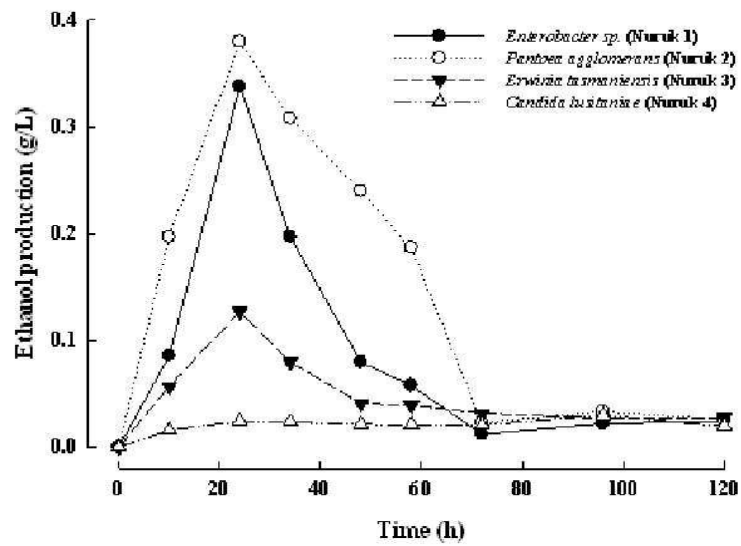
도면4



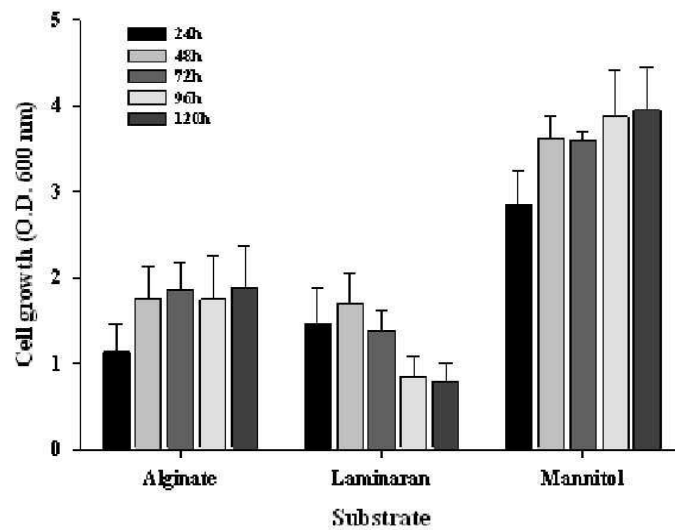
도면5a



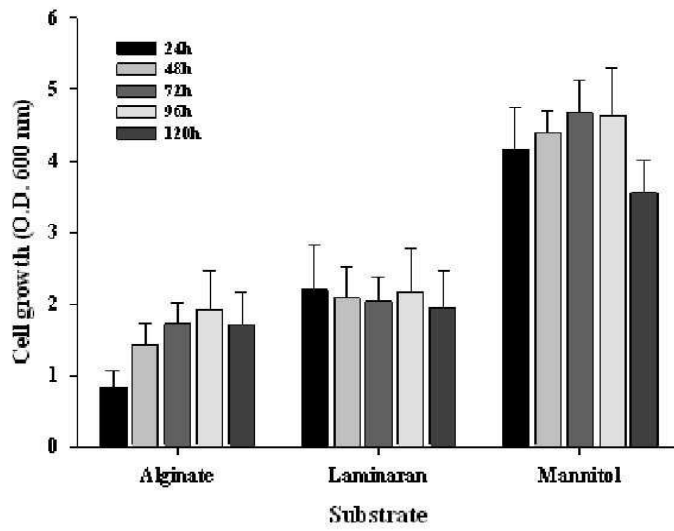
도면5b



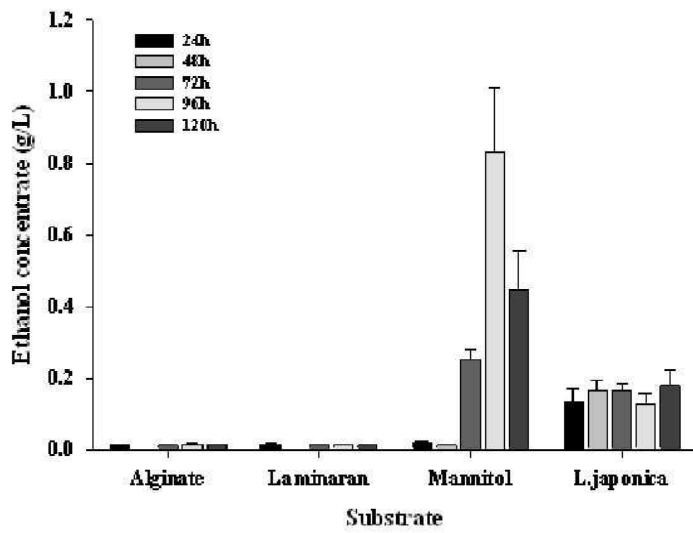
도면6a



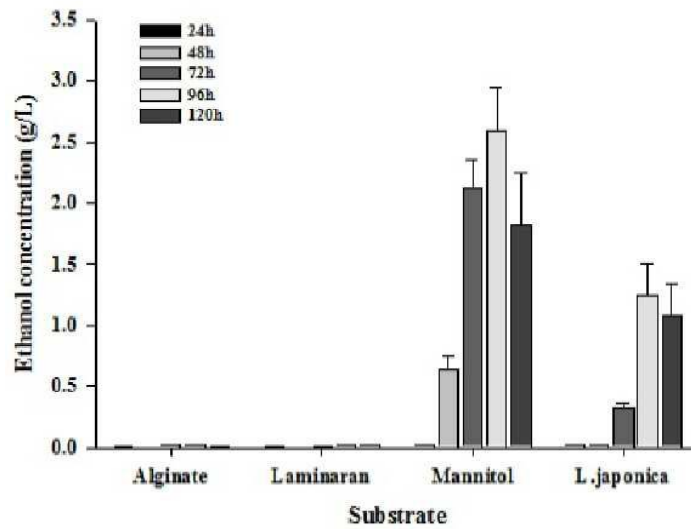
도면6b



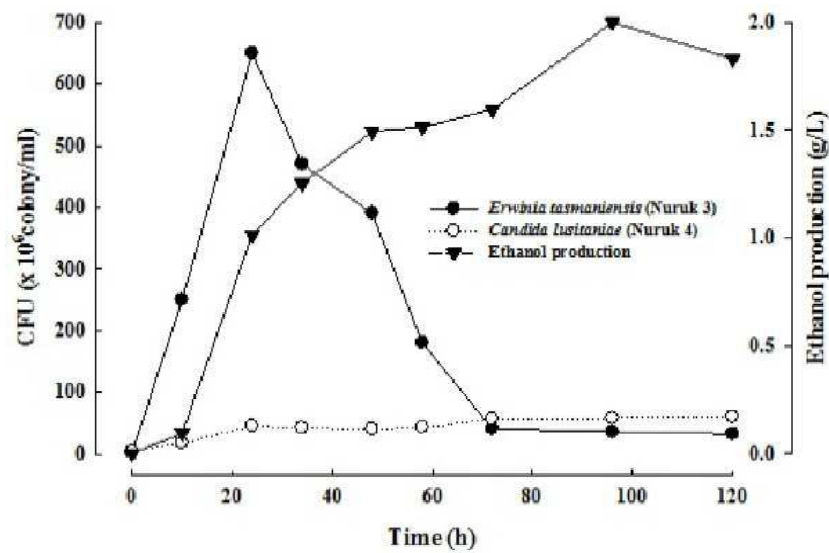
도면7a



도면7b



도면8



서열 목록

- <110> INHA Industry Partnership Institute
- <120> A METHOD OF PRODUCING BIO-ETHANOL USING THE MICROORGANISM
- <130> KP20110057
- <160> 6
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1
- <211> 20

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	27F primer	
<400>	1	
	agagtttgat cmtggctcag	20
<210>	2	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	1492R primer	
<400>	2	
	tacggytacc ttgttacgac tt	22
<210>	3	
<211>	1469	
<212>	DNA	
<213>	Erwinia tasmaniensis LJH3	
<400>	3	
	agattgaacg ctggcggcag gcctaacaca tgcaagtcga acggtagcac agagaagctt	60
	gcttcttggg tgacgagtg cggacgggtg agtaatgtct gggaaactgc ccgatggagg	120
	gggataacta ctggaaacgg tagctaatac cgcataacgt cttcgaccca aagtggggga	180
	ccttcgggcc tcacgccatc ggatgtgccc agatgggatt agctagtagg tggggtaacg	240
	gtcaccttag gcgacgatcc ctactgtgtc tgagaggatg accagccaca ctggaactga	300
	gacacggtcc agactcctac gggaggcagc agtggggaat attgcacaat gggcgcaagc	360
	ctgatgcagc catgccgcgt gtatgaagaa ggccttcggg ttgtaaagta ctttcagcgg	420
	ggaggaaggc gatgcgggta ataaccgcgt cgattgacgt taccgcgaga agaagcacccg	480
	gctaactccg tgccagcagc cgcggtaata cggagggtgc aagcgtaat cggaattact	540
	gggcgtaaag cgcacgcagg cggctctgtca agtcagatgt gaaatccccg ggcttaacct	600
	gggaactgca ttigaaactg gcaggctaga gtctttaga ggggggtaga attccaggtg	660
	tagcggtgaa atgcgtagag atctggagga ataccggtgg cgaaggcggc cccctggaca	720
	aagactgacg ctacggtgag aaagcgtggg gagcaaacag gattagatac cctggtagtc	780
	cacgccgtaa acgatgtcga cttggaggct gttcccttga ggagtggtct ccggagctaa	840
	cgcgttaagt cgaccgcctg gggagtacgg ccgcaagggt aaaactcaaa tgaattgacg	900

ggggcccgca caagcgggtgg agcatgtggt ttaattcgat gcaacgcgaa gaaccttacc 960
 tggccttgac atccacagaa ttcagcagag atgccttagt gccttcggga actctgagac 1020
 aggtgctgca tggctgtcgt cagctcgtgt tgtgaaatgt tgggttaagt cccgcaacga 1080
 gcgcaacctt tatcctttgt tgccagcgat tcggtcggga actcaaagga gactgccggt 1140
 gataaaccgg aggaagggtg ggggatgacg tcaagtcac atggccctta cggccagggc 1200

tacacacgtg ctacaatggc gcatacaaag agaagcgaac tcgcgagagc aagcggacct 1260
 cataaagtgc gtcgtatgcc ggatcggagt ctgcaactcg actccgtgaa gtcggaatcg 1320
 ctagtaatcg tggatcagaa tgccacggtg aatacgttcc cgggccttgt acacaccgcc 1380
 cgtcacacca tgggggagtg ggggttgcaa agaagtagta gcttaaccct tcgggagggc 1440
 gcttaccact ttgtgatcat gactggggt 1469

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ITS1 primer

<400> 4

tccgtaggtg aacctgcgg 19

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ITS4 primer

<400> 5

tcctccgctt attgatatgc 20

<210> 6

<211> 829

<212> DNA

<213> Candida lusitaniae LJH4

<400> 6

acctgcggaa ggatcattaa aaaatacatt acacattggt tttgcgaaca aaaaaataaa 60

tttttttatt cgaatttctt aatatcaaaa ctttcaacaa cggatctctt ggttctcgca 120

tcgatgaaga acgcagcgaa ttgcgatacg tagtatgact tgcagacgtg aatcatcgaa 180

tctttgaacg cacattgcgc ctcgaggcat tcctcgaggc atgcctgttt gagcgtcgca	240
tccccctctaa cccccgggta ggcgttgctc cgaaatatca accgcgctgt caaacacgtt	300
tacagcacga catttcgccc tcaaatcagg taggactacc cgctgaactt aagcatatca	360
atagtcggag gaaaaggatc attaaaaaat acattacaca ttgtttttgc gaacaaaaaa	420
ataaatTTTT ttattcgaat ttcttaatat caaaactttc aacaacggat ctcttggttc	480
tcgcatcgat aagaacgcag cgaatcgat acgtagtaga cttgcagacg tgaatcatcg	540
aatctttgaa cgcacattgc gcctcgaggc atttcnngag gcatgctgtt tngagcnnc	600
caccctctta accccgggta ngcnttgctc ccaaatatca cngcgggttt caaaaanttt	660
ttngnaaaaa gatTTTgtcc ccccnnaan gggggggaca ccccccnaa atanaaaan	720
tntttggggg ggaaaagaaa acctnnttaa tctganttn aaagccgncg gaaataatnt	780
ganctttcac attctntaac cctnctnaac ntgttcntn gatnngan	829