



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0087577
(43) 공개일자 2008년10월01일

(51) Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01) *C12N 1/00* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0030029

(22) 출원일자 2007년03월27일

심사청구일자 2007년03월27일

(71) 출원인

인하대학교 산학협력단

인천 남구 용현동 253 인하대학교

(72) 발명자

김은기

서울 강남구 대치동 316 은마아파트 8-212

김영범

인천 계양구 작전동 도두리 마을 동남아파트
518-2003

김동준

서울 강서구 화곡7동 353-18 진영빌라 나동 102호

(74) 대리인

이원희

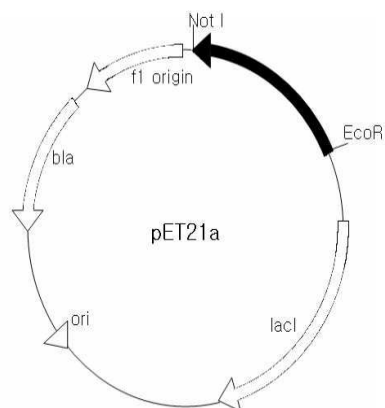
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 감귤과피 알칼리 추출물을 유효성분으로 포함하는 미생물배양배지

(57) 요약

본 발명은 감귤과피 알칼리 추출물을 유효성분으로 포함하는 미생물 배양배지에 관한 것으로, 구체적으로 폐감귤 박에서 추출된 알칼리 추출물을 이용하여 제조된 미생물 배양배지 및 그의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명의 미생물 배양배지는 광범위한 미생물중 즉 대장균, 바실러스속, 락토바실러스속, 슈도모나스속, 스트렙토마이세스속 및 효모속 미생물의 배양시 유용하게 이용할 수 있으며, 종래 사용되는 배양배지보다 저렴한 비용으로 생산이 가능하고, 재조합 플라스미드가 형질전환된 미생물의 증식지에 있어서 종래 배양배지와 동일한 효과를 보임으로, 산업적으로 광범위하게 이용되는 미생물의 생장에 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도2



특허청구의 범위

청구항 1

감귤과피 알칼리 추출물을 유효성분으로 포함하는 미생물 배양배지.

청구항 2

제 1항에 있어서, 감귤과피 알칼리 추출물은 액상 또는 분말 형태인 것을 특징으로 하는 미생물 배양배지.

청구항 3

제 1항에 있어서, 미생물은 대장균, 바실러스(*Bacillus*)속, 락토바실러스(*Lactobacillus*)속, 슈도모나스(*Pseudomonas*)속, 스트렙토마이세스(*Streptomyces*)속 및 효모(yeast)속 미생물로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 미생물 배양배지.

청구항 4

제 3항에 있어서, 바실러스속 미생물은 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 바실러스 코아굴런스(*Bacillus coagulans*), 바실러스 리첸리포르미스(*Bacillus licheniformis*) 및 바실러스 메가테리움(*Bacillus megaterium*)으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 미생물 배양배지.

청구항 5

제 3항에 있어서, 락토바실러스속 미생물은 락토바실러스 플란타눔(*Lactobacillus plantarum*) 또는 락토바실러스 아시도필리스(*Lactobacillus acidophilus*)인 것을 특징으로 하는 미생물 배양배지.

청구항 6

제 3항에 있어서, 슈도모나스속 미생물은 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*)인 것을 특징으로 하는 미생물 배양배지.

청구항 7

제 3항에 있어서, 스트렙토마이세스속 미생물은 스트렙토마이세스 카슈겐시스(*Streptomyces kasugaensis*)인 것을 특징으로 하는 미생물 배양배지.

청구항 8

제 3항에 있어서, 효모속 미생물은 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*) 또는 칸디다 봄비콜라(*Candida bombicola*)인 것을 특징으로 하는 미생물 배양배지.

청구항 9

제 1항에 있어서, 감귤과피 알칼리 추출물은 수산화칼슘(Ca(OH)_2)을 원료물질인 폐감귤박 전체 중량의 0.1 ~ 1.0 중량%가 되도록 처리하여 수득되는 것을 특징으로 하는 미생물 배양배지.

청구항 10

제 1항에 있어서, 감귤과피 알칼리 추출물은 수산화칼슘(Ca(OH)_2)을 원료물질인 폐감귤박 전체 중량의 0.5 중량%가 되도록 처리하여 수득되는 것을 특징으로 하는 미생물 배양배지.

청구항 11

제 1항에 있어서, 미생물은 재조합 플라스미드로 형질전환된 것을 특징으로 하는 미생물 배양배지.

청구항 12

제 1항에 있어서, 감귤과피 알칼리 추출물은 배지의 전체 부피에 0.1 내지 90 중량부로 포함되는 것을

특징으로 하는 미생물 배양배지.

청구항 13

제 1항에 있어서, 감귤과피 알칼리 추출물은 배지의 전체 부피에 0.1 내지 50 중량부로 포함되는 것을 특징으로 하는 미생물 배양배지.

청구항 14

제 1항에 있어서, 감귤과피 알칼리 추출물은 배지의 전체 부피에 0.1 내지 10 중량부로 포함되는 것을 특징으로 하는 미생물 배양배지.

청구항 15

제 1항에 있어서, 감귤과피 알칼리 추출물은 배지의 전체 부피에 0.1 내지 5 중량부로 포함되는 것을 특징으로 하는 미생물 배양배지.

청구항 16

- 1) 폐감귤박을 분쇄하는 단계;
 - 2) 단계 1)의 분쇄된 폐감귤박에 알칼리성 경화제를 첨가하는 단계;
 - 3) 단계 2)의 폐감귤박을 압출하는 단계;
 - 4) 단계 3)의 압출된 폐감귤박 여액 즉 알칼리 추출물을 분무건조하는 단계;
 - 5) 단계 4)의 분무건조된 폐감귤박 알칼리 추출물을 분무건조물을 수득하는 단계; 및
 - 6) 단계 5)의 감귤과피 알칼리 추출물을 포함하는 미생물 배양배지를 제조하는 단계
- 를 포함하는 미생물 배양배지 제조 방법.

청구항 17

제 16항에 있어서, 단계 2)의 알칼리성 경화제는 수산화칼슘($\text{Ca}(\text{OH})_2$), 수산화나트륨(NaOH) 및 산화칼슘(CaO)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 미생물 배양배지 제조 방법.

청구항 18

제 16항에 있어서, 단계 2)의 알칼리성 경화제는 전체 중량의 0.1 내지 1.0 중량%(weight %)가 되도록 첨가되는 것을 특징으로 하는 미생물 배양배지 제조 방법.

청구항 19

제 16항에 있어서, 단계 4)의 건조 방법은 마이크로웨이브를 이용하는 것을 특징으로 하는 미생물 배양배지 제조 방법.

청구항 20

제 16항에 있어서, 단계 4)의 건조 방법은 마이크로웨이브 및 분무건조를 순서적으로 이용하는 것을 특징으로 하는 미생물 배양배지 제조 방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<5> 본 발명은 감귤과피 알칼리 추출물을 유효성분으로 포함하는 미생물 배양배지에 관한 것으로, 더욱 상세하게는

폐감귤박에서 추출된 알칼리 추출물을 이용하여 제조된 미생물 배양배지 및 그의 제조방법에 관한 것이다.

<6> 미생물 배양에 있어서 원료물질로 탄수원, 질소원, 일반무기염류 등의 배지분이 사용되어지고 있으며, 탄수원, 질소원, 무기염류가 혼합된 형태의 추출물, 소화물 등이 사용되어지고 있다. 추출물로는 가장 많이 사용되는 것으로 효모 발효 추출물(yeast extract), 동물성 추출물로서 소고기 추출물(beef extract), 맥아 추출물(malt extract) 등이 있다. 소화물로는 펩톤 등의 가수분해산물로 단백질을 원료로 하여 산, 효소 등을 이용하여 아미노산 등의 미생물 필수 영양원으로 사용되어질 수 있는 물질로 제조된 것으로 우유, 콩, 육류, 미생물 등의 단백질 함유물질을 원료로 제조된다. 이러한 복합물질의 장점은 생체물질이 원료로 생체 발육에 필요한 여러 가지 비타민, 무기물, 탄소원, 질소원 등이 균형있게 포함되어 있어 미생물 배양용 배지성분의 주원료로 사용되어지고 있다. 예로서 LB 배지(Luria-Bertani medium)의 경우 효모 추출물(Yeast extract)와 트립신에 의해 소화된 단백질 가수분해물인 트립톤이 포함되어 있으며, 효모 배양시 많이 사용되는 YM 배지도 효모 추출물과 맥아 추출물이 포함되어 있다. 이러한 추출물은 미생물 성장에 중요한 역할을 하며, 산업적 미생물 배양에 있어서 가장 중요한 성분이다.

<7> 최근, 농업기술의 발전과 더불어 감귤 등의 과일의 생산량 또한 증가하고 있다. 이러한 생산량 증대로 인해 가격 형성과 수요 공급의 불균형으로 인한 감귤의 이용성 증대가 산업적으로 필요하게 되었고, 그로 인해 감귤 주스, 감귤 술 등의 가공품의 생산이 증가하게 되었다. 그러나 생산 증가에 더하여 부산물 또는 폐기물로서 감귤 과피와 찌꺼기 등의 발생 또한 증가되었으며, 감귤 착즙 후의 나머지 과피로 폐기된 감귤박은 잘 부패하지 않아 심각한 환경오염의 요인이 되고 있다.

<8> 감귤박에는 정유와 다종의 플라보노이드, 알칼로이드 및 비타민 등이 함유되어 있는 것으로 알려져 있다. 또한, 감귤의 향긋한 냄새는 정유 성분에 기인된 것으로 주성분은 리모넨(d-limonene)이며, 이 향긋한 냄새는 가축이 사료를 좀 더 많이 섭취할 수 있도록 유도한다. 최근에는 감귤박을 효과적으로 처리하는 방법들이 다각도로 연구되고 있으며, 감귤박을 분쇄하여 발효시키거나 건조시켜서 사료나 비료 또는 퇴비로 만드는 방법 및 감귤박 발효사료 생산 장치 등이 연구되고 있다.

<9> 한편, 감귤류, 그 착즙액 또는 착즙 농축액을 유산균, 효모균, 광합성 세균 등의 혐기성 미생물로 발효시킨 감귤 발효액 및 상기 감귤 발효액을 포함하는 양식어류용 사료에 관한 연구(대한민국 공개특허 제2002-0042047호)가 있다. 그러나 상기 방법은 양식용 어류에 있어 감귤박이 아닌 감귤 착즙액 자체를 사료 첨가제로서 이용하기 위한 것이다.

<10> 또한, 감귤과피로부터 효모균을 이용하여 사료를 제조함에 있어, 감귤과피를 착즙하여 착즙박과 착즙액으로 분리하고, 그 착즙액에 공지 균인 칸디다스 유틸리스(*Candida utilis*), 클루이베로마이세스 락티스(*Kluyveromyces lactis*) 및 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*) 중에서 선택된 어느 하나의 효모균을 배양시켜서 감귤과피 착즙액 효모 배양물을 얻은 다음, 이 효모 배양물을 그대로 상기 분리된 착즙박에 첨가시키고 이 혼합물을 건조시키는 것을 특징으로 하는 감귤과피를 이용한 사료의 제조방법이 공지된 바 있다(대한민국 특허 제 4229호). 그러나 상기 방법은 막대한 설비로 고비용을 필요로 하며, 부대장치가 많이 필요하고, 공정이 복잡하여 활용가치가 매우 떨어지는 문제점이 있다.

<11> 이에 본 발명자들은 감귤가공 중 발생하는 감귤가공 부산물을 수산화칼슘으로 조직을 경화시켜 탈수반응을 높이고, 다시 압축하여 발생된 압축여액을 고온에서 분무건조하여 미생물의 배양에 적합한 성분 및 고활성 증진물질이 함유된 감귤과피 알칼리 추출물을 제조하였으며, 이를 이용하여 미생물 배양배지를 제조하여 산업적 사용 빈도가 높은 여러 미생물, 효모, 진균의 생육 및 성장성 증진에 유용하며, 제조할 단백질을 생산하는 플라스미드로 형질전환된 미생물의 안정성이 확보됨을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<12> 본 발명은 폐감귤박에서 추출된 감귤과피 알칼리 추출물을 유효성분으로 포함하는 미생물 배양배지 및 그의 제조 방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

<13> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 감귤과피 알칼리 추출물을 유효성분으로 포함하는 미생물 배양배지를 제공한다.

<14> 또한, 본 발명은 감귤과피 알칼리 추출물을 유효성분으로 포함하는 미생물 배양배지의 제조 방법을 제공한다.

- <15> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- <16> 본 발명은 감귤과피 알칼리 추출물을 유효성분으로 포함하는 미생물 배양배지를 제공한다.
- <17> 본 발명자들은 폐감귤박을 분쇄한 후 수산화칼슘을 첨가하여 조직을 경화시키고 압출기를 이용하여 추출물을 획득하였다. 이후 마이크로웨이브를 이용하여 1차 건조하고, 2차로 분무건조하여 감귤과피 알칼리 추출물의 건조분말을 수득하였다(도 1 참조). 이 후 상기 감귤과피 알칼리 추출물의 건조분말을 이용한 미생물 배양배지를 제조하여 여러 종류의 미생물을 접종하여 미생물의 생육 정도를 조사하였다. 본 발명의 조사를 위해 접종된 미생물은 다음과 같다: 대장균(*E.coli*), 바실러스속(*Bacillus*) 미생물[바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 바실러스 코아굴런스(*Bacillus coagulans*), 바실러스 리체니포르미스(*Bacillus licheniformis*) 및 바실러스 메가테리움(*Bacillus megaterium*)], 락토바실러스속(*Lactobacillus*) 미생물[락토바실러스 플란타눔(*Lactobacillus plantarum*) 및 락토바실러스 아시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*)], 슈도모나스속(*Pseudomonas*)속 미생물[슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*)], 스트렙토마이세스속(*Streptomyces*) 미생물[스트렙토마이세스 카슈겐시스(*Streptomyces kasugaensis*)], 효모속 미생물[사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*) 및 칸디다 봄비콜라(*Candida bombicola*)]. 또한 대조시험군으로서 상기 미생물을 종래 시판된 미생물 성장용 배양배지에 함께 접종하였다.
- <18> 이후 대조시험군의 미생물의 생균수와 시험군인 본 발명의 미생물 배양배지에 접종한 미생물의 생균수를 비교하였다. 그 결과, 본 발명의 미생물 배양배지는 종래 시판된 미생물 성장용 배양배지보다 생균수가 최소 동일하거나 4~5배 높았다(표 2 및 표 3 참조). 본 발명자들은 재조합 플라즈미드 벡터가 형질전환된 대장균을 본 발명의 미생물 배양배지와 종래의 배양배지에 접종 및 배양하여 생균수를 측정하였다. 그 결과, 형질전환된 대장균은 종래의 배양배지보다 본 발명의 미생물 배양배지에서 높은 생균수를 보임이 관찰되었으므로, 본 발명의 미생물 배양배지는 재조합 단백질 생산에 유용하게 이용될 수 있다.
- <19> 아울러 본 발명의 미생물 배양배지의 제조 원가와 종래 산업적으로 이용되는 바실러스 서브틸리스 배양배지의 제조 원가를 비교하였다. 그 결과, 본 발명의 미생물 배양배지는 종래의 산업용 배지보다 제조 원가를 50% 감소시킬 수 있었다.
- <20> 상기 결과를 통해, 본 발명의 감귤과피 알칼리 추출물을 유효성분으로 포함하는 미생물 배양배지는 광범위한 미생물의 배양 및 재조합 단백질의 생산에 유용하게 이용될 수 있다.
- <21> 본 발명의 미생물 배양배지는 대장균, 바실러스(*Bacillus*)속, 락토바실러스(*Lactobacillus*)속, 슈도모나스(*Pseudomonas*)속, 스트렙토마이세스(*Streptomyces*)속 및 효모(yeast)속 미생물로 구성된 군 중 선택된 어느 하나를 배양하는데 이용되는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.
- <22> 상기 바실러스속 미생물로는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 바실러스 코아굴런스(*Bacillus coagulans*), 바실러스 리체니포르미스(*Bacillus licheniformis*) 및 바실러스 메가테리움(*Bacillus megaterium*)으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것이 바람직하나 이에 한정된 것은 아니며, 당해업계의 당업자에게 알려진 바실러스속 미생물이라면 본 발명의 미생물 배양배지를 이용하여 배양 가능하다.
- <23> 상기 락토바실러스속 미생물은 락토바실러스 플란타눔(*Lactobacillus plantarum*) 또는 락토바실러스 아시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*)인 것이 바람직하나 이에 한정된 것은 아니며, 당해업계의 당업자에게 알려진 락토바실러스속 미생물이라면 본 발명의 미생물 배양배지를 이용하여 배양 가능하다.
- <24> 상기 슈도모나스속 미생물은 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*)인 것이 바람직하나 이에 한정된 것은 아니며, 당해업계의 당업자에게 알려진 슈도모나스속 미생물이라면 본 발명의 미생물 배양배지를 이용하여 배양 가능하다.
- <25> 상기 스트렙토마이세스속 미생물은 스트렙토마이세스 카슈겐시스(*Streptomyces kasugaensis*)인 것이 바람직하나 이에 한정된 것은 아니며, 당해업계의 당업자에게 알려진 스트렙토마이세스속 미생물이라면 본 발명의 미생물 배양배지를 이용하여 배양 가능하다.
- <26> 상기 효모속 미생물은 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*) 및 칸디다 봄비콜라(*Candida bombicola*)인 것이 바람직하나 이에 한정된 것은 아니며, 당해업계의 당업자에게 알려진 효모속 미생물이라면 본 발명의 미생물 배양배지를 이용하여 배양 가능하다.
- <27> 본 발명의 미생물 배양배지는 재조합 단백질을 생산하기 위하여 재조합 플라스미드가 형질전환된 미생물을 배양

하는데 바람직하다.

- <28> 본 발명의 미생물 배양배지에 유효성분으로 포함된 감귤과피 알칼리 추출물은 폐감귤박에 알칼리성 경화제를 첨가하는 것이 바람직하며, 상기 알칼리성 경화제로는 수산화칼슘($\text{Ca}(\text{OH})_2$), 수산화나트륨(NaOH) 및 산화칼슘(CaO)으로 이루어진 군으로 선택되는 것이 바람직하며, 수산화나트륨을 이용하는 것이 더욱 바람직하며, 수산화칼슘을 이용하는 것이 가장 바람직하다. 상기 알칼리성 경화제는 원료물질인 폐감귤박 전체 중량의 0.1 내지 1.0 중량%(weight%)가 되도록 처리하여 수득되는 것이 바람직하다. 보다 바람직하게는 전체 중량의 0.5 중량%가 되도록 처리하는 것이다.
- <29> 본 발명의 미생물 배양배지는 감귤과피 알칼리 추출물을 배지 전체 부피에 0.1 내지 90 중량부로 포함하는 것이 바람직하며, 0.1 내지 50 중량부로 포함하는 것이 보다 바람직하며, 0.1 내지 10 중량부로 포함하는 것이 더욱 바람직하며, 0.1 내지 5 중량부로 포함하는 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니며, 당업자의 필요 및 배양할 미생물의 특성에 따라 포함할 중량부는 조절 가능하다.
- <30> 또한, 본 발명의 미생물 배양배지에 당업자의 필요 및 미생물의 특성에 따라 감귤과피 알칼리 추출물 이외에 종래 배양배지의 성분이 추가적으로 첨가될 수 있다. 상기 종래 배양배지의 성분으로는 효모 추출물, 효모 발효 추출물, 소고기 추출물, 맥아 추출물, 탄소원, 질소원 및 무기염류로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 성분을 추가적으로 첨가할 수 있으나 이에 한정된 것은 아니며, 당업자의 판단에 의해 미생물의 성장 및 재조합 단백질에 필요한 성분을 추가적으로 첨가할 수 있다.
- <31> 본 발명의 미생물 배양배지는 건조 분말로 제조될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니며, 액체 배지 및 고체 배지로도 제조될 수 있다.
- <32> 또한, 본 발명은 감귤과피 알칼리 추출물을 유효성분으로 포함하는 미생물 배양배지의 제조 방법을 제공한다.
- <33> 본 발명은 하기와 같은 제조 방법을 제공한다: 1) 폐감귤박을 분쇄하는 단계; 2) 단계 1)의 분쇄된 폐감귤박에 알칼리성 경화제를 첨가하는 단계; 3) 단계 2)의 폐감귤박을 압출하는 단계; 4) 단계 3)의 압출된 폐감귤박 여액 즉 알칼리 추출물을 1차 마이크로 웨이브로 건조하고 2차로 분무건조하는 단계; 5) 단계 4)의 분무건조된 폐감귤박 알칼리 추출물을 분무건조물을 수득하는 단계; 및 6) 단계 5)의 감귤과피 알칼리 추출물을 포함하는 미생물 배양배지를 제조하는 단계.
- <34> 상기 제조 방법에 있어서, 단계 2)의 알칼리성 경화제는 수산화칼슘($\text{Ca}(\text{OH})_2$), 수산화나트륨(NaOH) 및 산화칼슘(CaO)으로 이루어진 군으로 선택되는 것이 바람직하며, 수산화나트륨을 이용하는 것이 더욱 바람직하며, 수산화칼슘을 이용하는 것이 가장 바람직하다. 상기 알칼리성 경화제는 원료물질인 폐감귤박 전체 중량의 0.1 내지 1.0 중량%(weight%)가 되도록 처리하여 수득되는 것이 바람직하다. 보다 바람직하게는 전체 중량의 0.5 중량%가 되도록 처리하는 것이다.
- <35> 상기 제조 방법에 있어서, 단계 5)의 건조 방법은 마이크로웨이브를 이용하여 건조하는 것이 바람직하다.
- <36> 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.
- <37> 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일뿐, 본 발명이 하기 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.

<38> <실시예 1> 감귤과피 알칼리 추출물의 제조

- <39> 본 발명자들은 감귤과피가 포함되어있는 감귤가공 부산물에서 수산화칼슘을 이용하여 조직을 경화시키고 압출기를 이용하여 추출물을 획득하였다. 상세하게는 제주도 감귤주스 공장에서 나오는 가공폐기물인 폐감귤박(제주도, 감귤가공복합처리단지; 85% 수분함량) 330 kg(이중 고상부분: 52.1 kg, 액상부분 277.9 kg을 1차로 분쇄기(카타밀 등)를 이용하여 5-10 mm 크기로 분쇄(세단)한 후에 전체 무게에서 0.5%가 되도록 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 를 처리하여 1-10시간 사이로 방치하여 과피의 조직을 경화시킨 후에 면적비율에 의한 압출 공정을 통하여 고상부분 27%(55% 수분함량)와 액상부분 73%(95% 수분함량)로 분리하였다. 이 중 고상부분 89.1 kg은 CPP(citrus pulp pellet)를 생산하는데 사용되어지고(감귤배지 제조 공정과는 별도의 공정임), 액상부분(폐감귤박 가공폐수; Citrus waste water) 240.9 kg은 균 배양배지로 이용하기 위하여 건조하였다. 고형분 5%의 액상부분(감귤과피 알칼리 추출물)을 건조하기 위하여 240.9 kg의 추출액을 대상으로 1차 농축을 진행하였으며, 1차 농축의 경우 가정용 마이크로웨이브에 500 g씩 소분하여 50kg으로 농축하였고, 이때의 에너지 소비는 182kw를 소비하였다. 1차 농축을 통하여 추출액(50 kg)의 고형분 함량을 24.1%로 증가시켰다. 이후 분무건조기의 조건을 흡입구(inlet) 250

℃, 방출구(outlet) 120℃으로 하여 분무건조하였으며 이때 감귤과피 알칼리 추출물 분말은 12.045 kg 제조하였다. 건조된 분말은 수용액에서 수소이온농도가 7.2 였다.

<40> <실시예 2> 종래 산업용 배양배지의 원가 및 본 발명의 감귤과피 알칼리 추출물을 이용한 미생물 배양배지의 원가 비교

<41> 본 발명자들은 종래 바실러스 서브틸리스 산업용 배양배지의 원가와 감귤과피 알칼리 추출물을 이용한 미생물 배양배지의 원가를 비교하였다.

<42> 그 결과, 탈지대두분, 효모 추출물, 전분, 황산암모늄, 제 1인산칼륨, 염화칼슘 및 황산마그네슘으로 구성된 종래 Soybean meal 유래 바실러스속 배양배지는 리터당 99.15원이었으며, 본 발명의 미생물 배양배지의 원가는 리터당 45원이었다(표 1).

표 1

<43> 바실러스 서브틸리스 산업용 배양배지의 원가 및 본 발명 기술 배지의 원가 비교

일반적인 산업용배지				감귤과피 알칼리 추출물 미생물 배지			
성분	함유량 (g/L)	성분단가 (₩/kg)	추정원가 (₩/L)	성분	함유량 (g/L)	성분단가 (₩/kg)	추정원가 (₩/L)
탈지대두분	10	1,050	10.5	감귤과피 알칼리 추출물	30	1,500	45
효모추출물	6	12,000	72				
전분	8	1,050	8.4				
황산암모늄	5	280	1.4				
제1인산칼륨	3	1,800	5.4				
염화칼슘	1.55	450	0.7				
황산마그네슘	1.5	500	0.75				
합계			99.15	합계			45

<44> <실험예 1> 감귤과피 알칼리 추출물을 이용한 미생물 배지의 미생물 생육에 미치는 영향 조사

<45> 본 발명자들은 실시예 1의 감귤과피 알칼리 추출물을 이용한 미생물 배지에서 여러 종류의 미생물 생육을 조사하였다.

<46> 대장균, 락토바실러스, 바실러스 속 미생물의 미생물 생육을 조사하기 위하여 대조군으로 종래에 사용되는 미생물 배지를 이용하였다. 본 실험에 대조시험군으로 사용된 미생물 배지는 LB(Luria-Bertani; 1.0% Tryptone, 0.5% Yeast extract, 0.5% NaCl), TSB(Tryptic soy broth; 1.5% Tryptone, 0.5% Soytone, 0.5% NaCl), MRS 배지로서 Bacto™ (Becton, Dickinson and company, USA) 제품을 구입하여 사용하였다.

<47> 본 발명의 감귤과피 알칼리 추출물 3%가 함유된 수용액을 미생물 배지로 제조하여, 각각의 배지를 250 ml 삼각 플라스크에 50 ml씩 분주하였다. 이후 5노르말의 염산 또는 수산화나트륨을 이용하여 수소 이온 농도를 동일하게 7.0으로 맞춘 후 고온습식 멸균하였다(121℃, 20 분). 준비된 대조시험군 및 시험군 배지에 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*: ATCC 21332), 바실러스 코아굴런스(*Bacillus coagulans*), 바실러스 리체니포르미스(*Bacillus licheniformis*), 바실러스 메가테리움(*Bacillus megaterium*), *E. coli*, 락토바실러스 플란타눔(*Lactobacillus plantarum*), 락토바실러스 아시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*), 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*) 균주를 사용하였다. 배지는 전배양을 위해 TSB 배지를 사용하였고, 본배양시에는 바실러스 리체니포르미스, 바실러스 코아굴런스, 바실러스 서브틸리스, 바실러스 메가테리움은 TBS 배지에서, 바실러스 리체니포르미스, 바실러스 코아굴런스, 바실러스 서브틸리스, 바실러스 메가테리움, *E. coli*, 슈도모나스 푸티다는 LB 배지에서, 락토바실러스 플란타눔, 락토바실러스 아시도필러스는 MRS 배지에서 배양하였으며, 상기 시험군으로는 감귤과피 알칼리 추출물을 이용한 미생물 배양배지를 이용하였다. 배양은 TSB 배지 5 ml(w/v) 튜브에 1% 접종하여 30℃, 250 rpm으로 진탕 배양기(shaking incubator)에서 전배양 후 50 ml(w/v), 250 ml 플라스크에 1% 접종하여 30℃에서 1일 동안 배양하였다. 단 락토바실러스 속 미생물은 37℃에서 50 ml 튜브에 40 ml로 정치 배양하였다. 배양후 각각의 배양액을 순차적 희석(Serial dilution)을 수행한 후 LB 평판배지(한천

1.5% 함유)에 도달하여 생균수를 측정하였다.

<48> 그 결과, 본 발명의 감귤과피 알칼리 추출물에서 배양한 균의 생균수는 다른 배양배지에서 배양한 균의 생균수와 최소 동일하거나 4배 이상의 생균력 증진을 보임을 확인하였다(표 2).

표 2

<49> 감귤과피 알칼리 추출물이 미생물 생균력에 미치는 영향(cfu/ml)

Strain	Citrus		TSB		LB		MRS	
<i>B. licheniformis</i>	5.70E+09	6.00E+09	1.90E+09	1.80E+09	1.90E+09	2.05E+09		
<i>B. coagulans</i>	1.45E+09	1.60E+09	1.00E+09	1.15E+09	6.50E+08	7.50E+08		
<i>B. subtilis</i>	1.90E+09	2.00E+09	1.00E+09	9.50E+08	9.00E+08	7.50E+08		
<i>B. megaterium</i>	5.00E+08	4.50E+08	3.00E+08	2.50E+08	2.50E+08	3.50E+08		
<i>E. coli</i>	3.50E+09	4.50E+09			2.00E+09	1.50E+09		
<i>L. plantarum</i>	2.30E+09	6.00E+09					2.50E+09	1.75E+09
<i>L. acidophilus</i>	5.00E+09	4.50E+09					2.25E+09	3.12E+09
<i>P. putida</i>	9.80E+09	1.00E+10			3.50E+09	2.50E+09		

<50> 이후 본 발명자들은 스트렙토마이세스 속, 효모속 미생물이 감귤과피 알칼리 추출물을 이용한 미생물 배양배지 상에서의 생육을 조사하였다. 이때 YM(0.5% glucose, 0.5% peptone, 0.3% Yeast extract, 0.3% malt extract) 배지를 대조시험군으로 수행하였으며, 감귤과피 알칼리 추출물 5%가 함유된 수용액을 미생물 배양용 액상배지로 제조하였으며, 각각의 배지는 250 ml 삼각플라스크에 50 ml씩 분주한 후, 5노르말의 염산 또는 수산화나트륨을 이용하여 수소 이온 농도를 동일하게 4.0으로 맞춘 후 고온습식 멸균하였다(121℃, 20 분). 접종한 균주로는 스트렙토마이세스 카슈겐시스(*Streptomyces kasugaensis*), 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*), 칸디다 봄비콜라(*Candida bombicola*) 균주를 사용하였다. 배지는 전배양을 위해 YM 배지를 사용하였고, 본배양은 대조시험군으로 YM 배지를 이용하였으며, 시험군은 감귤과피 알칼리 추출물을 이용한 배양배지를 사용하였다. 배양은 YM 배지 5 ml(w/v) 튜브에 1% 접종하여 30℃, 250 rpm으로 진탕 배양기에서 전배양 후 50 ml(w/v), 250 ml 플라스크에 1% 접종하여 30℃에서 2일 동안 배양하였다. 배양이 끝난 뒤 각각의 배양액을 순차적 희석을 수행하였으며 YM 평판배지(한천 1.5%함유)에 도달하여 생균수를 측정하였다.

<51> 그 결과, 본 발명의 감귤과피 알칼리 추출물에서 배양한 균의 생균수는 다른 배양배지에서 배양한 균의 생균수와 최소 동일하거나 5배 이상의 생균력 증진을 보임을 확인하였다(표 3).

표 3

<52> 감귤과피 알칼리 추출물이 미생물 생균력에 미치는 영향(cfu/ml)

Strain	Citrus		YM	
<i>C. bombicola</i>	3.70E+08	9.50E+07	1.10E+08	7.80E+07
<i>S. cerevisiae</i>	1.95E+08	2.65E+08	7.00E+07	1.15E+08
<i>S. kasugaensis</i>	2.90E+07	2.00E+07	1.50E+07	8.75E+06

<53> <실험예 2> 감귤과피 알칼리 추출물을 이용한 미생물 배지의 플라스미드 안정성 검증

<54> 제조합 대장균 배양에 사용된 대조시험군에 사용된 배지는 LB(Luria-Bertani; 1.0% Tryptone, 0.5% Yeast extract, 0.5% NaCl)이며, 시험군에 사용된 배지는 액상배지로서 감귤과피 알칼리 추출물 3%가 함유된 수용액이다. 실험예 1과 같이 감귤과피 알칼리 추출물을 이용한 액상배지를 제조하였으며, 각각의 배지를 250 ml 삼각플라스크에 50 ml씩 분주한 후, 5노르말의 염산 또는 수산화나트륨을 이용하여 수소 이온 농도를 동일하게 7.0으로 맞춘 후 고온습식 멸균하였다(121℃, 20분). 이때 도 2와 같은 구조를 가지는 제조합 *E. coli* pET21a 균주를 사용하였다(바이오프로젠, 대전). 전배양을 위해 LB 배지를 사용하였고, 본 배양은 대조시험군에서는 LB 배지를 사용하였고, 시험군에서는 본 발명의 감귤과피 알칼리 추출물을 이용한 미생물 배양배지를 사용하였다. 배양은 LB배지 5 ml(w/v) 튜브에 1% 접종하여 30℃, 250 rpm으로 진탕 배양기에서 전배양 후 50 ml(w/v), 250 ml 플라스크에 1% 접종하고, 암피실린 100 ppm을 혼합하여 37℃에서 12시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후

각각의 배양액을 순차적으로 희석하였으며 LB 평판배지(한천 1.5% 함유, 암피실린 0/X)에 도말하여 생균수를 측정하였다.

<55> 그 결과, 본 발명의 감귤과피 알칼리 추출물을 이용한 미생물 배양배지는 일반적인 LB 배지와 같이 재조합 단백질 생산에 영향을 미치지 않음을 확인하였다(표 4).

표 4

<56> 감귤과피 알칼리 추출물이 재조합미생물 생균력에 미치는 영향(cfu/ml)

Strain	Citrus		LB	
생균수측정을 위한 평판배지에 암피실린 처리(100ppm)	0	X	0	X
<i>E. coli</i> pET21a	4.50E+09	4.65E+09	2.00E+09	3.15E+09

발명의 효과

<57> 본 발명의 미생물 배양배지는 대장균, 바실러스속, 락토바실러스속, 슈도모나스속, 스트렙토마이세스속 및 효모속 미생물의 배양시 종래 배양배지와 효과가 동일하거나 더 높은 생육 효과를 보이며, 종래 배양배지보다 50%까지 생산 단가를 낮출 수 있음으로 광범위한 미생물 배양배지로서 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

<1> 도 1은 감귤과피 알칼리 추출물을 포함하는 미생물 배양배지를 제조하는 공정을 나타낸 플로차트이다:

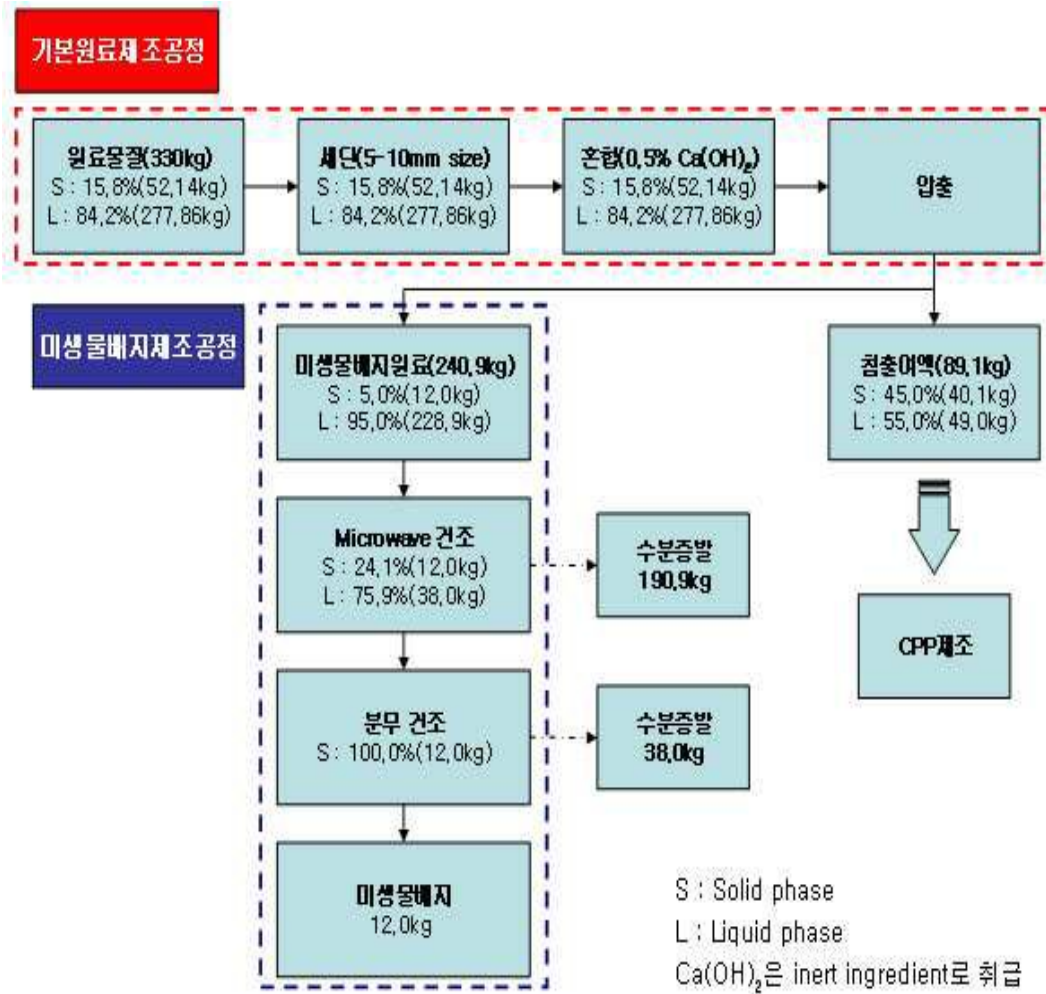
<2> S : 고상 ; 및

<3> L : 액상.

<4> 도 2는 본 발명의 미생물 배양배지 상에서 재조합 플라스미드 안정성을 확인하기 위해 사용된 재조합 플라스미드 지도이다.

도면

도면1



도면2

