(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0088401
(43) 공개일자 2014년07월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 19/00 (2006.01) *C07H 1/08* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0000235
(22) 출원일자 2013년01월02일
심사청구일자 2013년01월02일
기술이전 희망 : **기술양도**, **실시권허여**, **기술지도**

(71) 출원인
조선대학교산학협력단
광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)
(72) 발명자
정원교
광주광역시 서구 풍암1로 53, 104동 302호(풍암동, 현대삼환아파트)
천충길
전라남도 완도군 신지면 명사십리61번길 220 (조선대학교 해양생물연구교육센터)
(74) 대리인
위병갑

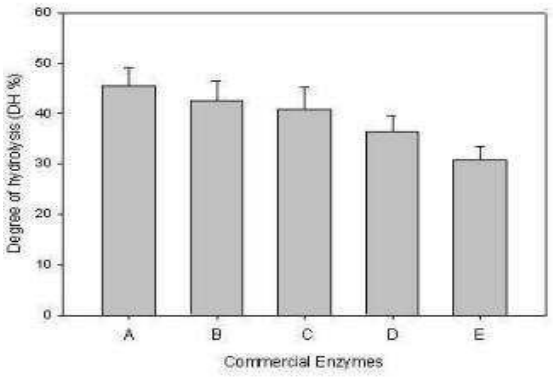
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **초식성 해양무척추동물 내장 유래 조효소를 이용하는 난분해성 해조류의 당화 방법**

(57) 요 약

본 발명은 초식성 해양무척추동물 내장 유래 조효소를 이용하여 해조류의 난분해성 물질을 당화시키는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 당화 방법에 따르면, 종래 효율적으로 이용되지 못한 난분해성 해조류 물질을 고효율로 당화시킴으로써 해조류의 당 성분을 효율적으로 분리 및 이용할 수 있다.

대 표 도 - 도3



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	109201-3
부처명	농림수산식품부
연구사업명	수산실용화기술개발사업
연구과제명	전복 소화분해시스템을 활용한 천연 항알러지 제품 개발
기 여 율	1/1
주관기관	조선대학교
연구기간	2009.06.01 ~ 2012.05.31

특허청구의 범위

청구항 1

초식성 해양무척추동물 내장 유래 조효소를 이용하는 것을 특징으로 하는 난분해성 해조류의 당화 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 초식성 해양무척추동물 내장 유래 조효소는 전복 내장 유래 조효소(Abalone Intestine Crude Enzymes, AICE)인 것을 특징으로 하는 난분해성 해조류의 당화 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 당화는 pH 6.0~8.0의 범위에서 수행하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 당화는 40~60℃의 범위에서 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 당화의 기질 농도는 2.5~5.5중량% 범위에서 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 당화의 상기 전복 내장 유래 조효소:기질이 1:10~1:100의 중량비로 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 당화는 10~20시간 동안 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 난분해성 해조류는 미역, 다시마, 감태, 다황 및 파래로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 초식성 해양무척추동물 내장 유래 조효소를 이용하여 해조류의 난분해성 물질을 당화시키는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 바이오 매스(Biomass)는 에너지 전용의 식물과 산림수목, 농산물과 사료작물, 농산 폐기물과 찌꺼기, 임산 폐기물과 부스러기, 수초, 동물의 배설물, 도시 쓰레기 등 산업폐기물, 기타 상기 폐기물 등에서 추출된 재생 가능한 유기물로서, 현재 에너지원으로 사용되고 있는 유기성 물질을 총칭한다. 이러한, 바이오 매스는 태양 에너지

를 저장하고 있는 거대한 에너지 창고이며 이를 효과적으로 사용할 수만 있다면 현재 화석연료의 과다한 사용이 가져 오는 에너지난을 손쉽게 해결할 수 있을 것이며 이러한 바이오 매스는 필요한 에너지량만큼을 배양해서 사용하기 때문에 대기 중에 이산화탄소의 과다한 축적을 방지할 수 있으므로 오늘날 극히 심각한 문제로 제기되고 있는 지구 온난화 문제를 해결할 수 있다.

[0003] 바이오 매스를 이용한 대체 에너지원 중 하나인 바이오 에탄올은 사탕수수, 옥수수 등 식물에서 추출한 연료로, 휘발유와 혼합하거나 단독으로 자동차 연료로 투입될 수 있어 바이오 디젤과 더불어 대표적인 재생 자원 에너지로 각광받고 있으나, 바이오 에탄올이 대체 에너지로 부상하면서 원료가 되는 옥수수, 사탕수수, 밀 등에 대한 수요가 급증해 곡물가격 급등의 한 요인이 되고 있다. 이와 같이, 곡물로부터 바이오 에탄올을 얻는 방법은 상기 언급한 곡물가격 급등의 문제뿐만 아니라, 곡물자원은 기아인구를 위한 식량으로 쓰여야 한다는 비난으로부터 자유롭지 못한 단점이 있는 바, 세계 바이오 에탄올 시장은 현재 곡물계에서 목질계로 방향을 돌리고 있지만, 목질계는 리그닌 제거 등 까다로운 공정 문제로 돌파구를 찾지 못하고 있는 실정이다.

[0004] 이에, 최근에는 바이오 에탄올의 제조원료로서 해조류가 각광받고 있다. 해조류(algae)는 생장속도가 빨라 대량생산이 가능하며, 별도의 비료나 농업 용수를 필요로 하지 않으며, 여러 가지 당 성분과 알긴산을 다량 함유하고 있어서 에너지로 전환하기에 적합하며, 탄수화물의 함량이 목질계 원료에 비해 1.5 내지 2 배 정도 높은 특징이 있다. 또한, 이러한 해조류는 리그닌에 비해 치밀하지 않은 조직을 가지므로 기존의 바이오 매스에 비해 상대적으로 당화가 용이하며, 생산량도 매우 방대하다는 장점이 있다. 또한, 상대적으로 풍부한 해양자원을 활용할 수 있어 대단한 잠재력을 가지고 있다.

[0005] 한편, 전복(abalone)은 원시복족목 전복과에 속하는 연체동물의 총칭이며, 이 중 참전복은 전복의 북방형 아종으로서, 긴 타원형의 껍데기는 두께가 얇고 표면이 울퉁불퉁하며, 물이 통과하는 3~4개의 흡수공(吸水孔)이 있다. 성숙하면 암컷의 난소는 짙은 녹색을, 수컷의 정소는 연한 노란색 또는 유백색을 띤다. 수온이 낮은 북부 연안에 분포하고, 전복류 중에서는 가장 얕은 곳에 살며 수심 약 15m 이내이고 바닷물이 깨끗해 해조류가 많이 번식하는 곳에 서식한다. 미역, 다시마, 감태, 대황, 파래 등 해초류가 주식이며 한국과 일본에 분포한다. 수분 함량이 많고 단백질, 지방의 함량은 적은 편으로 영양이 체내에서 잘 흡수되어 회복기의 환자나 노약자를 위한 건강식으로 많이 쓰인다.

[0006] 특히, 완도 참전복(*Haliotis discus* hannai)은 완도의 청정 미역, 다시마 등을 주로 먹고 자라며, 타우린, 메티오닌 등 우수 아미노산이 풍부하며 비타민과 미네랄 또한 타 지역에 비해 그 함량이 매우 우수하다.

[0007] 종래 전복의 이용은 주로 참전복 껍질을 이용한 진주양식 방법, 예를 들어, 전복을 모패로 한 반구(반원)진주의 양식방법(대한민국 등록특허 제10-0005994호), 전복진주 양식방법((대한민국 등록특허 제10-0002933호), 전복껍질을 이용한 진주의 양식 방법(대한민국 등록특허 제10-0090613호) 등과, 요리 재료로서 전복을 이용하는 방법, 예를 들어 전복껍질을 이용한 한방삼계탕과 흑미전복삼계탕 및 녹차전복삼계탕 조리방법(대한민국 등록특허 제10-0897947호), 전복 통조림의 제조방법 및 그에 의해 제조된 전복 통조림(대한민국 등록특허 제10-0665131호), 전복 내장 젓갈의 제조방법 및 그에 의해 제조된 전복 내장젓갈(대한민국 등록특허 제10-0696887호), 주성분 전복분말을 포함하는 전복가루 및 이의 제조방법(대한민국 특허출원 제10-2007-0022333호) 등에 국한되어 있었다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 특허문헌 1. KR 10-2010-0049866 A

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 해조류의 난분해성 물질을 효과적으로 분해함으로써 해조류에 풍부하게 존재하는 당 성분을 효율적으로 분리하기 위한 당화 방법을 제공하고자 하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기와 같은 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 초식성 해양무척추동물 내장 유래 조효소를 이용하는 것을 특징으로 하는 난분해성 해조류의 당화 방법을 제공한다.

[0011] 상기 당화는 pH 6.0~8.0의 범위에서 수행하는 것이 바람직하다.

[0012] 상기 당화는 40~60℃의 범위에서 수행되는 것이 바람직하다.

[0013] 상기 당화의 기질 농도는 2.5~5.5중량% 범위에서 수행되는 것이 바람직하다.

[0014] 상기 당화의 상기 전복 내장 유래 조효소:기질이 1~10~100의 중량비로 수행되는 것이 바람직하다.

[0015] 상기 당화는 10~20시간 동안 수행되는 것이 바람직하다.

[0016] 상기 난분해성 해조류는 미역, 다시마, 감태, 다황 및 파래로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것이 바람직하다.

발명의 효과

[0017] 본 발명의 당화 방법에 따르면, 종래 효율적으로 이용되지 못한 난분해성 해조류 물질을 고효율로 당화시킴으로써 해조류의 당 성분을 효율적으로 분리 및 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 전복의 내장 구조를 나타낸 것이다.

도 2는 전복 내장 조효소의 2D-PAGE 패턴을 나타낸 것이다.

도 3은 전복 내장 조효소와 시판되는 효소의 기질에 대한 가수분해도를 비교한 그래프이다. 가로축은 각각 A: AICE, B: Viscozyme L, C: Celluclast 1.5L FG, D: AMG 300L, E: Ultraflo L을 나태낸다.

도 4는 전복 내장 조효소를 이용한 해조류의 가수분해에서 pH의 영향을 나타낸 것이다.

도 5는 전복 내장 조효소를 이용한 해조류의 가수분해에서 온도의 영향을 나타낸 것이다.

도 6은 전복 내장 조효소를 이용한 해조류의 가수분해에서 기질 농도의 영향을 나타낸 것이다.

도 7은 전복 내장 조효소를 이용한 해조류의 가수분해에서 효소 대 기질의 비의 영향을 나타낸 것이다.

도 8은 전복 내장 조효소를 이용한 해조류의 가수분해에서 시간의 영향을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0020] 본 발명의 발명자들은 차세대 바이오 매스로서 각광받고 있는 해조류를 효율적으로 당화시키기 위한 방법에 대한 연구를 거듭한 결과, 전복의 내장에서 유래한 조효소(crude enzymes)가 기존 시판 효소보다 해조류의 당화율이 우수함을 확인하였고, 이를 이용하여 최적의 당화 효율을 얻을 수 있는 당화 방법을 완성하였다.

[0021] 따라서, 본 발명은 전복 내장 유래 조효소(Abalone Intestine Crude Enzymes, AICE)를 이용하는 것을 특징으로 하는 난분해성 해조류의 당화 방법을 제공한다.

[0022] 상기 전복 내장 유래 조효소(Abalone Intestine Crude Enzymes, AICE)는 전복 내장에서 유래된 효소(단백질)들의 총체적 집단을 말하며, 전복이 먹이로 하는 물질에 대한 분해 효능을 가지고 있다.

[0023] 본 발명의 전복 내장은 도 1에 나타낸 바와 같은 해부학적 구조를 가지고 있다. 전복 내장은 전복의 주요 먹이인 해조류를 소화 분해시키는 주요 기관이다.

[0024] 본 발명에서는 전복 가공시 대량으로 발생되는 내장에 함유된 기능성 단백질체(proteome)의 조성을 분석하고, 이들이 함유한 효소군을 확보하여 해조류 유래 난분해성 물질을 당화 공정에 최종 활용하고자 하였다.

[0025] 보다 구체적으로, 본 발명에서는 분리한 전복 소화기관인 내장을 대상으로, 균질화 및 염석과정을 거쳐 단백질체를 추출한 다음, 2D-SDS PAGE 및 아미노산서열 비교분석을 통해 전복 내장에 함유된 기능성 포로테옴(proteome)을 분석하였다.

[0026] 또한, 이들 전복 내장 유래 조효소(Abalone Intestine Crude Enzymes, AICE)의 당 및 단백질 기질에 대한 최적 가수분해 조건으로 pH, 온도, 기질 농도, 기질 대 효소비, 반응시간 등을 조사하여 난분해성 해조류의 최적 당화 조건을 확립하였으며, pH 6.0~8.0, 반응 온도 40~60℃, 기질 농도 2.5~5.5중량%, 전복 내장 유래 조효소:기질의 비 1~10~100, 반응 시간 10~20시간인 것이 바람직하다.

[0027] 본 발명의 난분해성 해조류는, 예를 들어, 미역, 다시마, 감태, 다황 또는 파래 등을 들 수 있으나, 여기에 한정되는 것은 아니다.

[0028] 이하에서는, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다.

[0029] **<실시예 1>**

[0030] 전복 내장 조효소의 분리

[0031] 전복의 각 소화기관을 대상으로 균질화 및 염석 과정을 통해 단백질체를 추출한 다음, 전복 내장 단백질체 추출은 Jung 등의 방법 (2006)에 따라 실시하였다. 모든 과정은 4℃에서 실시되었으며, 전복 내장에 대하여 완충용액 (50 mM phosphate buffer containing 5 mM $CaCl_2$, pH 7.2)을 2배 가량 첨가하여 균질기로 12,000 rpm에서 2분 동안 2회 반복하여 균질화시켰다. 균질물을 cheese-cloth로 일차 필터한 후, 40℃ 항온수조에서 3시간 동안 활성화시키고, 원심분리 (9,500×g)하여 얻어진 상층액에 약 80% 농도까지 황산암모늄을 첨가하여 2℃ 냉장실에서 6시간 동안 방치하여 두고 침전물을 얻었다. 회수된 단백질에서 불용성 단백질 부분을 제거하기 위하여 동량의 증류수를 첨가하여 원심분리 (9,500×g, 10 min)하였다. 상층액을 10 kDa 한외여과막으로 분획 및 탈염한 다음, 10 kDa 이상 획분을 동결건조하여 사용 전까지 80℃에 저장하였다. 다음 2D-SDS-PAGE 및 아미노산 서열 비교분석을 통해 전복 내장에 함유된 프로테옴(proteome)을 분석하였다.

[0032] 분석 결과, 전복의 내장(소화기관)에는 염색된 스팟(spot)들의 수만큼 다양한 단백질들이 함유되어 있는 것으로 확인되었다(도 2 참조).

[0033] 또한, 이차원적으로 분리된 단백질의 등전점(PI) 및 분자량(MW) 정보를 바탕으로 기능성 효소군에 해당하는 스팟(단백질체)들을 선별하여, in-gel digestion 및 LC tandem MS 분석을 수행함으로써 전복 내장에 함유된 다양한 효소군을 파악할 수 있었다.

[0034] 또한, MASCOT 분석을 통해 전복 내장에서 규명된 효소들에 대한 정보는 표 1에 정리하여 나타내으며, 검토된 효소들은 대부분 기존학술문헌에 의해 보고된 종들이며, 전복 내장 자체발현 효소와 공생 미생물에 의해 발현된 효소들로 구성되어 있음을 확인하였다.

표 1

Class	Specific enzyme
Carbohydrases	alginase, laminarase, xylanase, mannosidase, mannase, galactosidase, glucoronidase, glucosidase, fucosidase, N-acetyl-β-glucosaminidase * un-identified as endo-/exo- or α-/β- anomers
Proteinases	pepsin, trypsin, α-chymotrypsin, leucine aminopeptidase (AP), Valine AP, Cystine AP
Lipases	esterase, esterase lipase
Misc.	catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, thioredoxin peroxidase, thioredoxin, alkaline phosphatase, acid phosphatase, naphtol-phosphohydrolase

[0035]

[0036] **<실시예 2>**

[0037] **전복 내장 조효소의 최적 활성 조건 확립**

[0038] **<2-1> 상용 효소와의 가수분해도 비교**

[0039] 전복 내장 유래 조효소(AICE)를 이용한 가수분해도(degree of hydrolysis: DH)는 다시마 가공부산물 분말(powder)을 기질로 활용하였으며, 초기 기준 조건은 pH 7.0, 1% 기질용액, 기질 대 효소비 100:1이 되도록 한 후 38℃에서 8시간 반응시켰다.

[0040] 반응 종료 후 원심 분리한 상층액 2 ml를 취하여 해조류 주 구성성분인 단백질 및 다당류가 가수분해되어 유리되는 저분자펩타이드 및 환원당 함량비를 Lowry 및 DNS 법에 따라 측정하여 계산하였다.

[0041]
$$\text{가수분해도 (\%)} = \frac{\text{가수분해 후 저분자 환원당 또는 펩타이드 함량}}{\text{기질 내 총 당 또는 단백질 함량}} \times 100$$

[0042] 해당 조건에서 AICE의 해조류 기질에 대한 가수분해 활성은 상용효소인 Viscozyme L, Celluclast 1.5L FG, AMG 300L, Ultraflo L (Novozyme Co.)와 유사한 수준의 가수분해도를 나타내었다(도 3).

[0043] **<2-2> 최적 pH 조건 분석**

[0044] 기질에 대한 AICE 가수분해의 최적 pH 조건을 검토한 결과(도 4), pH 7.5 - 8.0 부근에서 가장 높은 활성을 보였다. 최적 pH 조건에서는 초기 조건의 가수분해도 약 45%에 비해 높은 수치를 나타내었다(약 50%). Suzuki 등(2006)의 보고에 따르면 *H. discus* hannai에서 분리한 oligoalginate lyase가 pH 7.1 부근에서 가장 높은 활성을 나타내었다.

[0045] **<2-3> 최적 온도 조건 분석**

[0046] 다시마 부산물(sea tangle by-products), 즉 식용 및 양식사료로 가공되는 엽체 부위를 제외한 뿌리, 줄기, 포자엽 건조분말에 대한 AICE 최적온도는 도 5에서와 같이 50℃에서 최대 활성을 나타내었으며, 그 이후부터 서서히 감소하는 것을 알 수 있었다. 50℃ 이후 완만한 활성변화는 온도에 따른 해조류의 물리적 분해로 사료되며 해당 조건에서의 가수분해율은 약 55%로 상승하였다. Suzuki 등 (2006)의 보고에 따르면 *H. discus* hannai에서 분리한 oligoalginate lyase가 42℃ 부근에서 가장 높은 활성을 나타내었다.

[0047] **<2-4> 최적 기질 농도 분석**

[0048] 최적 기질농도는 0.5%에서 증가하기 시작하여 3%의 기질농도에서 가장 효율이 높은 것으로 나타났으며 보다 높은 농도에서는 서서히 감소함을 보여주였다(도 6).

[0049] **<2-5> 최적 기질 대 효소비 분석**

[0050] 기질 대 효소비에 대한 가수분해 효과는 도 7과 같이 기질 대 효소비가 10:1에서 최고 효율을 나타내었지만, 효소 첨가량에 따른 가수분해물의 생산성을 감안해 본 결과, 최적의 기질 대 효소비를 50:1인 것으로 관찰되었다.

[0051] **<2-6> 반응 시간 분석**

[0052] 다양한 반응시간에 따른 가수분해도를 측정한 결과, 가수분해도가 반응시간이 12시간까지 뚜렷하게 증가하다가 그 이후로는 완만한 상승곡선을 나타내었다(도 8).

[0053] **<실시예 3>**

[0054] **최적 반응 조건하에서의 저분자 가수분해물 수율**

[0055] 상기 항목 2의 최적 조건 상에서 다시마 부산물 파우더 1 kg으로부터 AICE에 의한 저분자 가수분해물을 최종 약 560 g을 확보할 수 있었다. 즉 최대 수율은 56%로 확인되었다.

[0056] 분석 결과, 다시마 부산물 기질에 대한 전복 내장 조효소(AICE)의 최적 활성은 하기 표 2에 나타낸 바와 같이, pH 7.5, 50℃DML 온도, 3% 기질농도, 효소 대 기질 반응비가 1:50, 12시간의 반응시간이 전복 내장 조효소(AICE)의 최적 효소 활성 반응 조건임을 알 수 있었다.

표 2

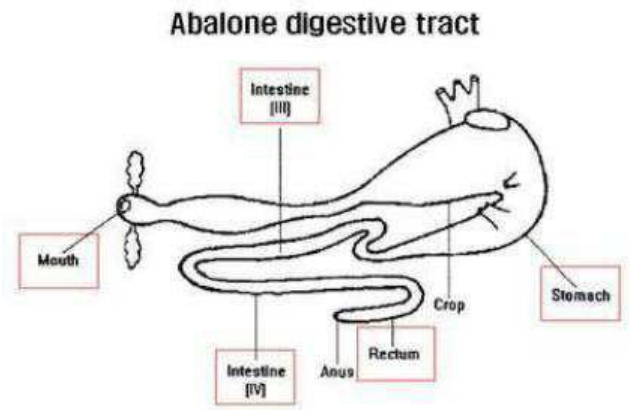
[0057]

Enzyme vs. Substrate	Optimal conditions					
	pH	Temp (℃)	Conc. substrate (%)	E:S ratio	Incubation time (hr)	Degree of Hydrolysis (%)
AICE vs. Sea tangle by-products	7.5	50	3	1:50	12	66

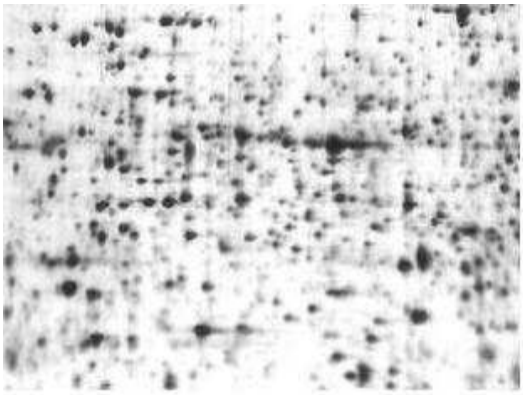
[0058] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

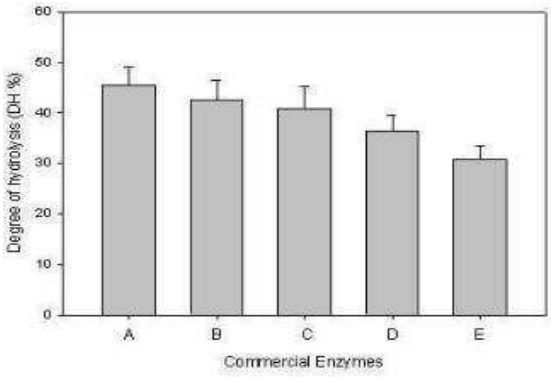
도면1



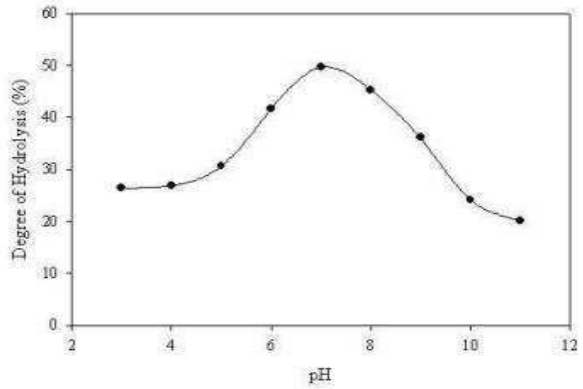
도면2



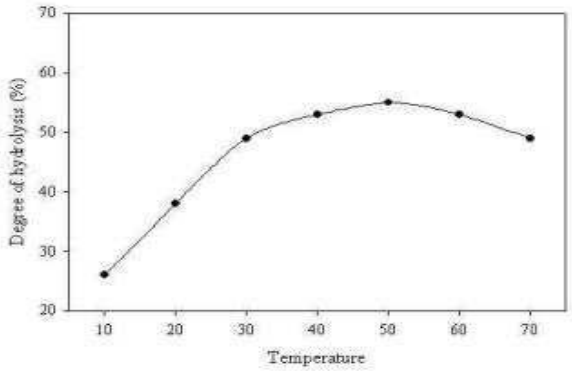
도면3



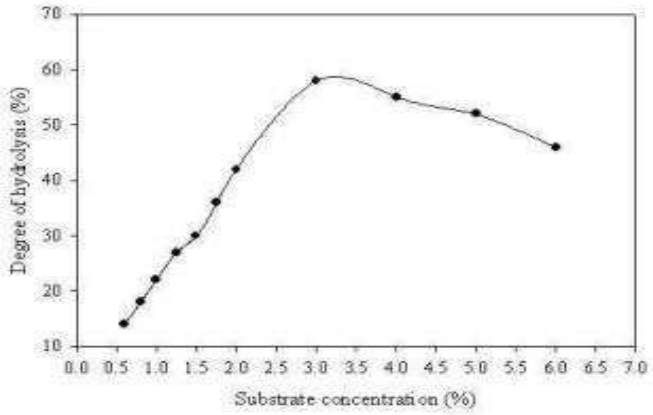
도면4


Degree of Hydrolysis (%)
pH
0
10
20
30
40
50
60
2
4
6
8
10
12

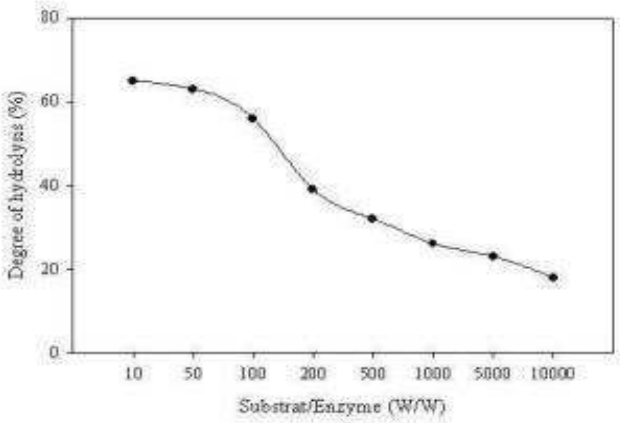
도면5


Degree of hydrolysis (%)
Temperature
20
30
40
50
60
70
10
20
30
40
50
60
70

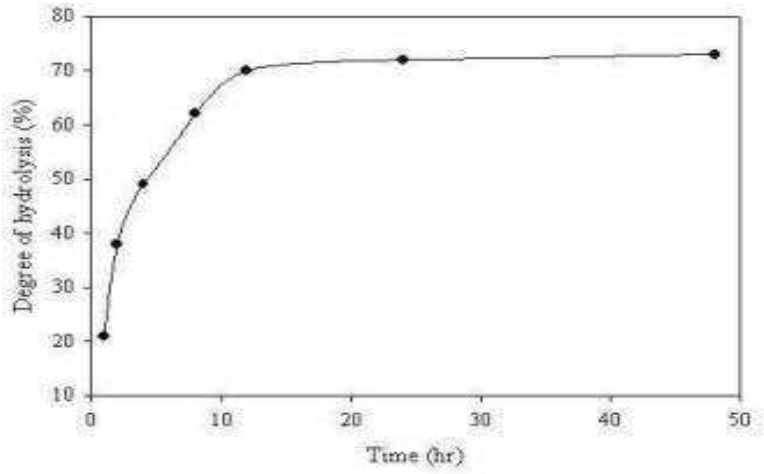
도면6


Degree of hydrolysis (%)
70
60
50
40
30
20
10
0.0 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 3.0 3.5 4.0 4.5 5.0 5.5 6.0 6.5 7.0
Substrate concentration (%)

도면7


Degree of hydrolysis (%)
80
60
40
20
0
10 50 100 200 500 1000 5000 10000
Substrat/Enzyme (W/W)

도면8


Degree of hydrolysis (%)
Time (hr)
80
70
60
50
40
30
20
10
0
10
20
30
40
50