(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0054833
(43) 공개일자 2008년06월19일

(51) Int. Cl.
C12N 1/20 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2006-0127427
(22) 출원일자 2006년12월13일
심사청구일자 2006년12월13일

(71) 출원인
부경대학교 산학협력단
부산 남구 용당동 산 100번지 부경대학교내
(72) 발명자
이진우
부산 사하구 다대1동 1552번지 대우아파트 103동 503호
조강익
부산 영도구 동삼1동 510-7번지 도개공아파트 2단지 203동 1201호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이덕록

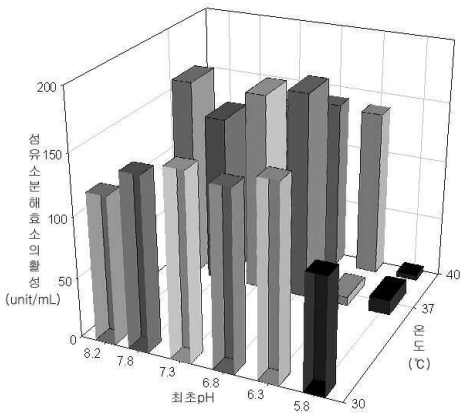
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 왕겨를 함유한 바실러스 서브틸리스 서브스페시스서브틸리스 A－5 3 균주의 생산방법

(57) 요 약

본 발명은 왕겨와 같은 농업 부산물을 함유한 섬유소 분해효소를 생산하는 균주의 생산방법에 관한 것이다. 본 발명은 섬유소 분해효소를 생산하는 바실러스 서브틸리스 서브스페시스 서브틸리스 A-53 균주(*Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* A-53; 기탁번호 KACC 91179P)를 왕겨를 함유한 생산방법에 관한 것이다. 본 발명에 기재된 액상배양방법을 이용하여 사상균 및 곰팡이의 증식속도에 비하여 증식속도를 증가시켜 경제적으로 섬유소 분해효소를 대량생산함으로써 섬유소 분해효소의 생산성을 향상시키는 뛰어난 효과가 있다.

대표도 - 도6



(72) 발명자

이보화

경남 창원시 사림동 148-15

김보경

부산 사하구 다대2동 현대아파트 114동 1102호

특허청구의 범위

청구항 1

탄소원, 질소원 및 무기염을 함유하는 액상배지로서, 탄소원으로 왕겨, 미강, 말토스, 과당, 설탕 또는 포도당으로 구성된 군으로부터 선택되는 것 중에서 하나를 함유하고, 질소원으로 효모추출물, 펩톤, 말트추출물, 트립톤, 암모니아펄페이트 또는 암모니아나이트레이트로 구성된 군으로부터 선택되는 것 중 하나를 함유하며, 무기염으로 0.5%(w/w) K_2HPO_4, 0.1%(w/w) NaCl, 0.02%(w/w) $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.06%(w/w) $(NH_4)2SO_4$을 함유하는 액상배지에서 배양온도 30 내지 40℃로 3 내지 5일 동안 배양하는 것을 특징으로 하는 서브틸리스 서브스페시스 서브틸리스 A-53 균주(*Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* A-53; 기탁번호 KACC 91179P)의 배양방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 탄소원이 왕겨 1 내지 10%(w/w), 질소원이 효모추출물 0.05 내지 1%(w/w) 함유된 것임을 특징으로 하는 서브틸리스 서브스페시스 서브틸리스 A-53 균주의 배양방법.

청구항 3

제 1항 내지 2항 중 어느 한 항의 방법으로 배양된 서브틸리스 서브스페시스 서브틸리스 A-53 균주.

명 세 서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<9> 본 발명은 왕겨를 이용한 섬유소 분해효소를 생산하는 바실러스 서브틸리스 서브스페시스 서브틸리스 A-53 균주(*Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* A-53; 기탁번호 KACC 91179P)의 생산방법에 관한 것이다.

<10> 섬유소 분해효소(cullulase)란 섬유소(cellulose)를 가수분해시키는 효소로서, 섬유소 분해효소에 의해 가수분해된 섬유소는 셀로바이오스(cellobiose)로 변하고, 이는 다시 β-글루코시다아제(β-glucosidase)에 의해 포도당으로 가수분해된다. 섬유소 분해효소는 *T. viride*나 *T. reesei* 등과 같은 *Tricoderma* 종들이나 *Aspergillus niger*나 *Thermomonospora*와 같은 곰팡이, 그리고 몇 가지 *Clostridium* 종에 의해서 생산되는 것으로 보고된 바 있다.

<11> 산업적인 규모로 섬유소 분해효소를 생산하는 종래기술은 *Tricoderma* 종들이나 *Aspergillus* 종과 같은 곰팡이를 고체배양(solid state fermentation)하여 섬유소 분해효소를 생산하고 있으나 고체배양은 액체배양에 비하여 비효율적이며 곰팡이는 세균에 비하여 생육속도가 낮기 때문에 생산성이 낮아 섬유소 분해효소의 가격이 높은 편이다.

<12> 또한, 섬유소 분해효소를 생산하기 위하여 섬유소 분해효소 생산균을 배양하기 위해 일반적으로 배지의 탄소원으로는 포도당 및 설탕을 사용하고 질소원으로는 효모추출물을 사용하고 있기 때문에 생산비용을 가중시키고 있는 실정이다.

<13> 본 발명 농업부산물인 왕겨를 함유한 섬유소 분해효소 생산방법은 기존의 포도당이나 말토스 등 고가의 탄소원을 함유한 것보다 경제적이고 효율적으로 섬유소 분해효소를 생산할 수 있는 특징을 가지고 있다.

<14> 본 발명에서 사용한 바실러스 서브틸리스 서브스페시스 서브틸리스 A-53 균주(기탁번호 KACC 91179P)는 대한민국 특허등록번호 10-0652186호에 공지된바 있다.

<15> 따라서 본 발명의 목적은 왕겨를 함유하여 섬유소 분해효소를 생산하는 바실러스 서브틸리스 서브스페시스 서브틸리스 A-53 균주의 생산방법을 제공하는데 있다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<16> 본 발명의 상기 목적은 탄소원으로는 왕겨, 미강, 말토스, 과장, 설탕 및 포도당을 사용하였으며, 질소원으로는

효모추출물, 펩톤, 말트추출물, 트립톤, 암모니아설페이트 및 암모니아나이트레이트를 사용하여 각각 혼합한 36종의 배지에 바실러스 서브틸리스 서브스페시스 서브틸리스 A-53 균주(Bacillus subtilis subsp. subtilis A-53; 기탁번호 KACC 91179P)를 배양하고 균주 증식 및 섬유소 분해효소의 활성을 측정하였다.

<17> 이하, 본 발명의 구체적인 구성을 실시예를 들어 상세히 설명하지만 본 발명의 권리범위를 본 발명의 실시예에만 한정하지는 않는다.

발명의 구성 및 작용

<18> 본 발명은 탄소원으로 왕겨 1 내지 10%(w/w), 질소원으로 효모추출물 0.05 내지 1%(w/w)를 함유한 배지에서 pH 5.8 내지 8.2에서 배양온도 30 내지 40℃에서 3 내지 5일 배양함을 특징으로 하는 섬유소 분해효소를 생산하는 바실러스 서브틸리스 서브스페시스 서브틸리스 A-53 균주(*Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* A-53; 기탁번호 KACC 91179P)의 생산방법을 제공한다.

<19> 본 발명은 본 발명자에 의해 농촌진흥청 농업생명공학연구원 한국농업미생물자원센터에 2005년 10월 26일자로 기탁된 바실러스 서브틸리스 서브스페시스 서브틸리스 A-53 균주(Bacillus subtilis subsp. subtilis A-53; 기탁번호 KACC 91179P)를 사용하였다.

<20> 본 발명에서 섬유소 분해효소는 배지 속의 탄소원을 당으로 전환시키므로, 환원당의 생성량 증가는 섬유소 분해효소의 활성이 높은 것을 의미한다.

<21> 본 발명에서 섬유소 분해효소의 활성은 유닛(unit)을 계산하였으며 1 unit은 섬유소를 가수분해하여 20분 동안 1μmol의 환원당을 생산하는 효소의 양을 의미한다.

<22> 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.

<23> 본 발명은 각각의 탄소원 및 질소원에 따른 바실러스 서브틸리스 서브스페시스 서브틸리스 A-53 균주의 성장을 측정하는 단계; 각각의 탄소원 및 질소원에 따른 바실러스 서브틸리스 서브스페시스 서브틸리스 A-53 균주의 섬유소 분해효소 생산 활성을 측정하는 단계; 왕겨 및 효모추출물의 농도에 따른 바실러스 서브틸리스 서브스페시스 서브틸리스 A-53 균주의 성장을 측정하는 단계; 왕겨 및 효모추출물의 농도에 따른 바실러스 서브틸리스 서브스페시스 서브틸리스 A-53 균주의 섬유소 분해효소 생산 활성을 측정하는 단계; 배지의 pH 및 배양온도에 따른 바실러스 서브틸리스 서브스페시스 서브틸리스 A-53 균주의 성장을 측정하는 단계; 배지의 pH 및 배양온도에 따른 바실러스 서브틸리스 서브스페시스 서브틸리스 A-53 균주의 섬유소 분해효소 생산 활성을 측정하는 단계; 생물배양기의 교반속도에 따른 바실러스 서브틸리스 서브스페시스 서브틸리스 A-53 균주의 섬유소 분해효소 생산 활성을 측정하는 단계 및 생물배양기의 통기량에 따른 바실러스 서브틸리스 서브스페시스 서브틸리스 A-53 균주의 섬유소 분해효소 생산 활성을 측정하는 단계로 구성된다.

<24> 이하, 본 발명의 구체적인 구성을 실시예를 들어 상세히 설명하지만, 본 발명의 권리 범위가 하기 실시예에만 한정되는 것은 아니다.

<25> **실시예 1: 각각의 탄소원 및 질소원에 따른 바실러스 서브틸리스 서브스페시스 서브틸리스 A-53 균주의 성장측정**

<26> 섬유소 분해효소를 생산하는 바실러스 서브틸리스 서브스페시스 서브틸리스 A-53 균주를 마린액상배지(Marine broth)에 한 백금니 접종하고, 30 내지 40℃에서 진탕 배양기의 진탕 속도를 150 내지 200rpm으로 60 내지 80시간 동안 배양하여 종균 배양액을 배양하였다. 상기 종균 배양액을 다시 본 발명에서 혼합제조된 섬유소 분해효소 생산배지에 3 내지 5%(v/v)로 접종하고, 30 내지 40℃에서 150 내지 200rpm으로 3 내지 5일 동안 배양하였다.

<27> 상기 섬유소 분해효소 생산배지는 탄소원으로는 왕겨(rice hull), 미강(rice bran), 말토스(maltose), 과당(fructose), 설탕(sucrose) 및 포도당(glucose)을 사용하고 질소원으로는 효모추출물(yeast extract), 펩톤(peptone), 말트추출물(malt extract), 트립톤(tryptone), 암모니아설페이트(ammonium sulfate) 및 암모니아나이트레이트(ammonium nitrate)를 각각 혼합하여 본 발명 36종의 배지를 제조하였다.

<28> 상기 본 발명 36종의 배지에서 배양된 바실러스 서브틸리스 서브스페시스 서브틸리스 A-53 균주의 배양액에서 상등액을 제거하고 균체의 건조 중량을 측정하여 각 조건에서의 바실러스 서브틸리스 서브스페시스 서브틸리스 A-53 균주의 성장을 측정하였다.

<29> 그 결과, [도 1]에서 나타난 바와 같이, 탄소원와 질소원이 각각 포도당과 펩톤이 함유된 배지 또는 말토스와

펩톤이 함유된 배지에서 바실러스 베레첸시스 A-68 균주의 성장이 뛰어났다.

<30> **실시예 2: 탄소원 및 질소원에 따른 바실러스 서브틸리스 서브스페시스 서브틸리스 A-53 균주의 섬유소 분해효소 측정**

<31> 상기 실시예 1에서 배양된 바실러스 서브틸리스 서브스페시스 서브틸리스 A-53 균주 배양액을 5,000 내지 9,000XG의 범위에서 10 내지 30분 동안 원심분리한 후 균체를 제거하고 상등액만을 수득하였다. 상등액 속의 섬유소 분해효소의 활성을 측정하기 위하여 0.5mL의 상등액과 0.5mL의 1.0%(w/w) CMC(carboxy methyl cellulose) 용액을 혼합하여 50℃에서 20분 동안 방치한 다음, 환원당의 생성 정도를 측정하였다.

<32> 그 결과, [도 2]에 나타난 바와 같이, 섬유소 분해효소의 활성은 탄소원과 질소원을 각각 왕겨과 효모추출물 함유하고 72시간 동안 배양한 배지에서 섬유소 분해효소의 활성이 약 80 unit/mL으로 가장 높은 것으로 나타났다. 그 다음으로는 왕겨와 트립톤, 미강과 트립톤을 함유한 배지에서 섬유소 분해효소의 활성이 높게 나타났다.

<33> **실시예 3: 왕겨와 효모추출물의 농도에 따른 바실러스 서브틸리스 서브스페시스 서브틸리스 A-53 균주의 성장 측정**

<34> 상기 실시예 1과 같은 방법으로 바실러스 서브틸리스 서브스페시스 서브틸리스 A-53 균주를 배양하고 본 발명에서 사용한 탄소원으로 왕겨를 0, 1, 2, 3, 5 및 10% 농도로 하고 질소원으로 효모추출물을 0, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 및 1.0% 농도로 각각 혼합하여 36종의 배지를 제조하였다.

<35> 상기 36종의 배지에서 배양된 바실러스 서브틸리스 서브스페시스 서브틸리스 A-53 균주의 배양액에서 상등액을 제거한 균체의 건조 중량을 측정하여 각 조건에서의 바실러스 서브틸리스 서브스페시스 서브틸리스 A-53 균주의 성장을 측정하였다.

<36> 그 결과, [도 3]에서 나타난 바와 같이, 왕겨와 효모추출물의 농도가 각각 10% 및 1.0% 함유된 배지에서 바실러스 서브틸리스 서브스페시스 서브틸리스 A-53 균주의 성장이 가장 뛰어나게 나타났다.

<37> **실시예 4: 왕겨 및 효모추출물의 농도에 따른 바실러스 서브틸리스 서브스페시스 서브틸리스 A-53 균주의 섬유소 분해효소 측정**

<38> 상기 실시예 3의 바실러스 서브틸리스 서브스페시스 서브틸리스 A-53 균주의 배양액에서 생산된 섬유소 분해효소의 활성을 실시예 2에서와 같은 방법으로 측정하였다. 그 결과, [도 4]에 나타난 바와 같이, 섬유소 분해효소의 활성은 왕겨와 효모추출물의 농도가 각각 5%와 0.5% 함유된 배지에서 배양된 바실러스 서브틸리스 서브스페시스 서브틸리스 A-53 균주의 섬유소 분해효소의 활성이 약 150 unit/mL으로 가장 높았다.

<39> **실시예 5 : 배지의 초기 pH 및 배양온도에 따른 바실러스 서브틸리스 서브스페시스 서브틸리스 A-53 균주의 성장측정**

<40> 본 발명 왕겨와 효모추출물을 함유한 배지의 초기 pH를 5.8, 6.3, 6.8, 7.3, 7.8 및 8.2로 하고 배양온도를 30, 37 및 40℃로 하여 총 18가지 배양조건에서 바실러스 서브틸리스 서브스페시스 서브틸리스 A-53 균주를 배양이었다.

<41> 상기 배양조건에서 바실러스 서브틸리스 서브스페시스 서브틸리스 A-53 균주의 성장을 측정한 후 배양액에서 상등액을 제거한 균체의 건조 중량을 측정한 결과, [도 5]에서 나타난 바와 같이 초기 배지의 pH가 6.8이며 배양온도 37℃에서 바실러스 서브틸리스 서브스페시스 서브틸리스 A-53 균주를 배양했을 때 가장 뛰어난 성장을 나타내었다.

<42> **실시예 6: 배지의 초기 pH 및 배양온도에 따른 바실러스 서브틸리스 서브스페시스 서브틸리스 A-53 균주에 의한 섬유소 분해효소 측정**

<43> 상기 실시예 5에서의 18가지 배양조건에서 바실러스 베레첸시스 A-68 균주를 배양하고 생산된 섬유소 분해효소의 활성을 실시예 2에서와 같은 방법으로 측정하였다. 그 결과, [도 6]에 나타난 바와 같이, 섬유소 분해효소의 활성은 초기 배지의 pH가 6.8이며 배양온도 37℃에서 바실러스 베레첸시스 A-68 균주를 배양한 경우에 섬유소 분해효소 활성이 약 150 unit/mL으로 가장 높았다.

<44> **실시예 7: 생물배양기의 교반속도에 따른 바실러스 서브틸리스 서브스페시스 서브틸리스 A-53에 의한 섬유소 분해효소 측정**

<45> 본 발명의 바실러스 서브틸리스 서브스페시스 서브틸리스 A-53 균주를 실시예 1과 같은 방법으로 종균 배양하였

으며, 종균 배양액을 4L의 섬유소 분해효소 생산배지가 담긴 7L 생물배양기에 3 내지 5%(v/v)로 접종하고 30 내지 40℃에서 3 내지 5일 동안 배양하였다.

<46> 본 발명에서 사용한 탄소원은 왕겨를 사용하고 질소원으로 효모추출물을 사용하였다. 생물배양기의 교반속도는 각각 200, 300 및 400 rpm으로 하였다. 각각의 생물배양기에 배양된 배양액들에 생산된 섬유소 분해효소의 활성을 실시예 2와 같은 방법으로 측정하였다. 그 결과, [도 7]에 나타난 바와 같이, 섬유소 분해효소의 활성은 생물배양기의 교반속도를 400 rpm으로 유지하여 배양할 때 섬유소 분해효소 활성이 약 130 unit/mL으로 가장 높은 것으로 나타났다.

<47> **실시예 8: 생물배양기의 통기량에 따른 바실러스 서브틸리스 서브스페시스 서브틸리스 A-53에 의한 섬유소 분해효소 측정**

<48> 본 발명의 바실러스 서브틸리스 서브스페시스 서브틸리스 A-53 균주를 실시예 1과 같은 방법으로 종균 배양하였으며, 종균 배양액을 4L의 섬유소 분해효소 생산배지가 담긴 7L 생물배양기에 3 내지 5%(v/v)로 접종하고 30 내지 40℃에서 3 내지 5일 동안 배양하였다. 본 발명에서 사용한 탄소원은 왕겨를 사용하고 질소원으로 효모추출물을 사용하였다. 생물배양기의 통기량은 각각 0.5, 1.0 및 1.5vvm이었다.

<49> 각각의 생물배양기에 배양된 배양액들에 생산된 섬유소 분해효소의 활성을 실시예 2와 같은 방법으로 측정한 결과, [도 8]에 나타난 바와 같이, 섬유소 분해효소의 활성은 생물배양기의 통기량을 1.0vvm으로 유지하여 배양할 때 섬유소 분해효소 활성이 약 150 unit/mL으로 가장 높은 것으로 나타났다.

발명의 효과

<50> 상기 실시예를 통하여 설명한 바와 같이, 농업 부산물인 왕겨를 함유한 배지에서 서브틸리스 서브스페시스 서브틸리스 A-53 균주(*Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* A-53; 기탁번호 KACC 91179P)가 가장 높은 성장과 섬유소 분해효소 생산성을 확인하였으며 환경오염을 감소시키는 친환경적인 생산 공정을 확립하였다. 또한, 기존의 고체배양에 비하여 경제성이 높은 액체배양 방법을 제공함으로써 환경산업상 매우 유용한 발명인 것이다.

도면의 간단한 설명

<1> 도 1은 본 발명 탄소원으로 왕겨, 미강, 말토스, 과당, 설탕 및 포도당을 사용하고 질소원으로 효모추출물, 펩톤, 말트추출물, 트립톤, 암모니아설페이트 및 암모니아나이트레이트를 각각 사용하여 바실러스 서브틸리스 서브스페시스 서브틸리스 A-53 균주를 배양하였을 때 균체의 증식을 비교한 것이다.

<2> 도 2는 본 발명 탄소원으로 왕겨, 미강, 말토스, 과당, 설탕 및 포도당을 사용하고 질소원으로 효모추출물, 펩톤, 말트추출물, 트립톤, 암모니아설페이트 및 암모니아나이트레이트를 사용하여 바실러스 서브틸리스 서브스페시스 서브틸리스 A-53 균주를 배양하였을 때 균주가 생산하는 섬유소 분해효소의 활성을 비교한 것이다.

<3> 도 3은 본 발명 탄소원으로 왕겨 1 내지 10%를 사용하고 질소원으로 효모추출물을 0.05 내지 1.0%를 사용하여 바실러스 서브틸리스 서브스페시스 서브틸리스 A-53 균주를 배양하였을 때의 균체 증식을 비교한 것이다.

<4> 도 4는 본 발명 탄소원으로 왕겨 1 내지 10%를 사용하고 질소원으로 효모추출물 0.05 내지 1.0%를 사용하여 바실러스 서브틸리스 서브스페시스 서브틸리스 A-53 균주를 배양하였을 때 균주가 생산하는 섬유소 분해효소의 활성을 비교한 것이다.

<5> 도 5는 본 발명 탄소원으로 왕겨 5%, 질소원으로 효모추출물 0.5%를 사용하고 배지의 pH를 5.8 내지 8.2로 조절하여 배양온도 30℃, 37℃ 및 40℃에서 각각 배양하였을 때의 바실러스 서브틸리스 서브스페시스 서브틸리스 A-53 균주의 증식을 비교한 것이다.

<6> 도 6은 본 발명 탄소원으로 왕겨 5%, 질소원으로 효모추출물 0.5%를 사용하고 배지의 pH를 5.8 내지 8.3로 조절하여 배양온도 30℃, 37℃ 및 40℃에서 각각 배양하였을 때 바실러스 서브틸리스 서브스페시스 서브틸리스 A-53 균주가 생산하는 섬유소 분해효소의 활성을 비교한 것이다.

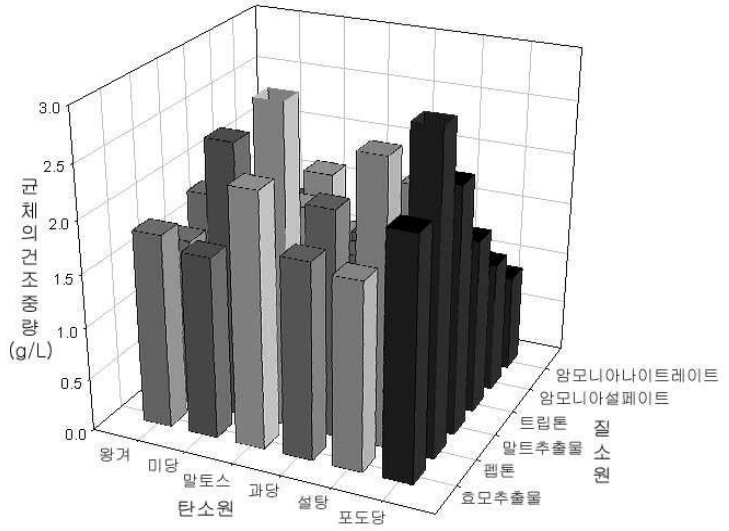
<7> 도 7은 본 발명 탄소원으로 왕겨 5%, 질소원으로 효모추출물 0.5%를 사용하고 배양기 교반속도 200, 300 및 400 rpm에서 각각 배양하였을 때 바실러스 서브틸리스 서브스페시스 서브틸리스 A-53 균주가 생산하는 섬유소 분해효소의 활성을 비교한 것이다.

<8> 도 8은 본 발명 탄소원으로 왕겨 5%, 질소원으로 효모추출물 0.5%를 사용하고 통기량을 0.5, 1.0 및 1.5vvm으로 각각 배양하였을 때 바실러스 서브틸리스 서브스페시스 서브틸리스 A-53 균주가 생산하는 섬유소 분해효소의 활

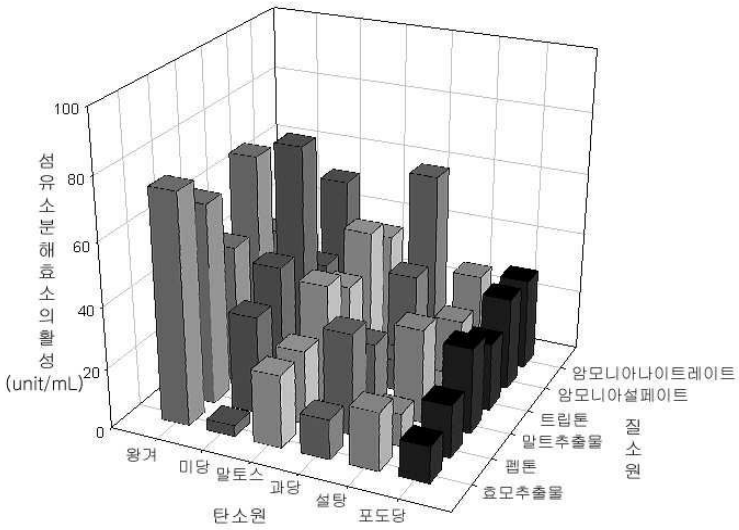
성을 비교한 것이다.

도면

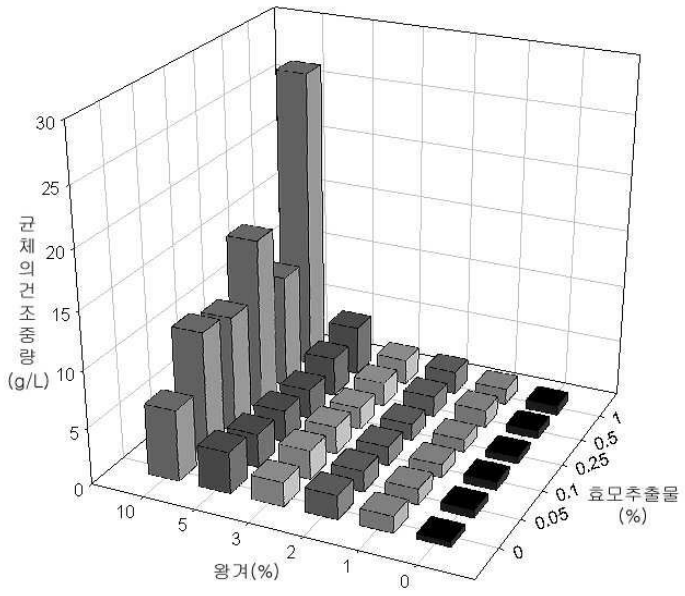
도면1



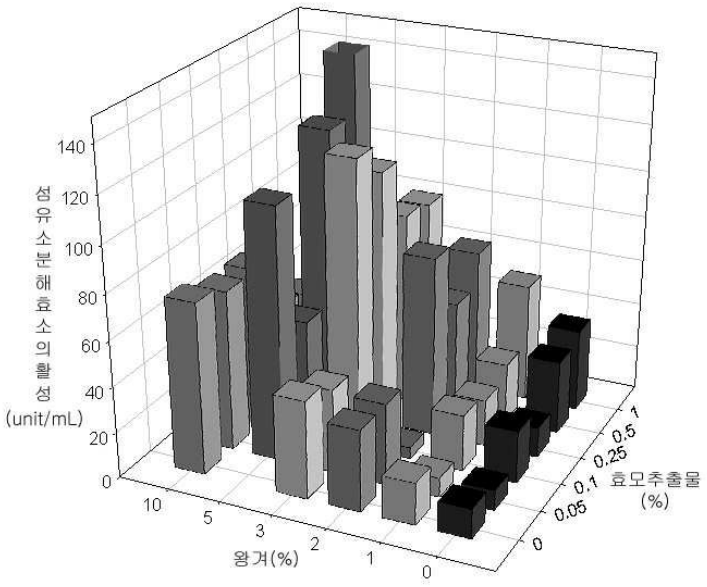
도면2



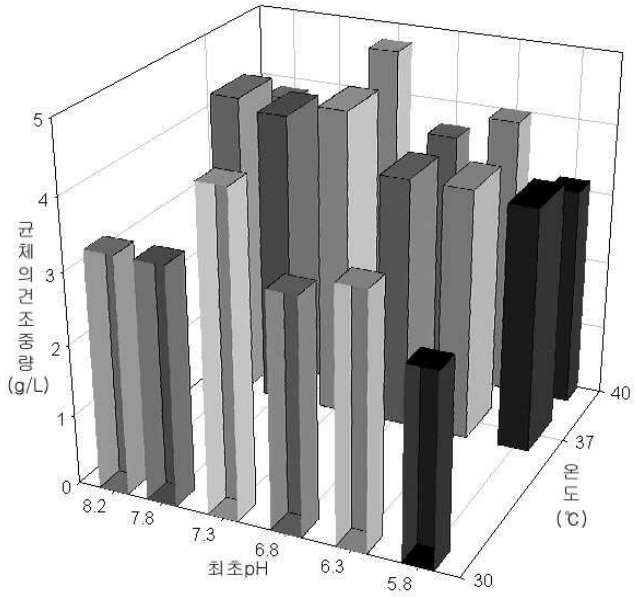
도면3


균체의건조중량 (g/L)
30
25
20
15
10
5
0
왕겨(%)
10
5
3
2
1
0
효모추출물 (%)
1
0.5
0.25
0.1
0.05
0

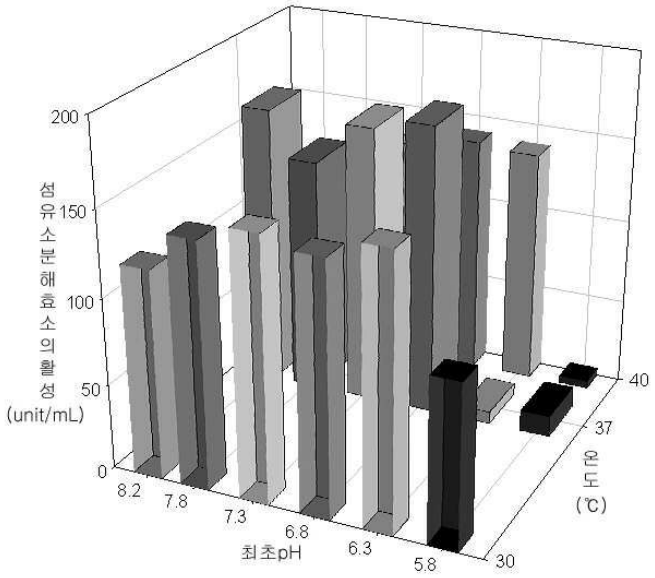
도면4


섬유소분해효소의활성 (unit/mL)
140
120
100
80
60
40
20
0
왕겨(%)
10
5
3
2
1
0
효모추출물 (%)
1
0.5
0.25
0.1
0.05
0

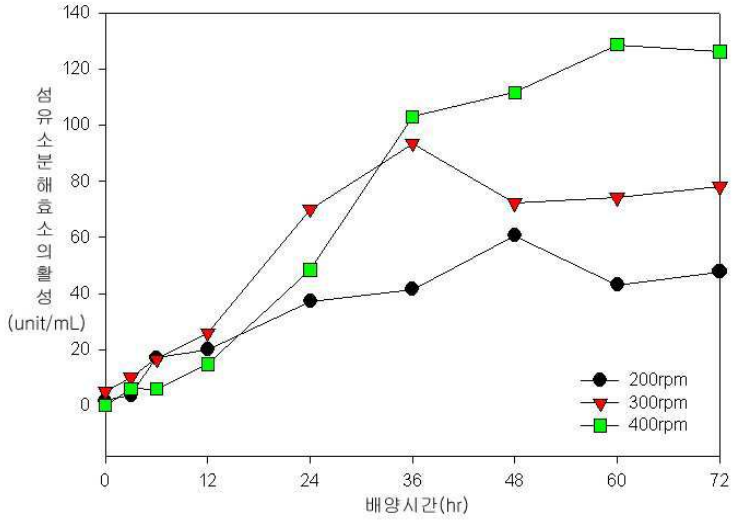
도면5


균체의건조중량
(g/L)
0
1
2
3
4
5
8.2
7.8
7.3
6.8
6.3
5.8
최초pH
30
37
40
온도
(℃)

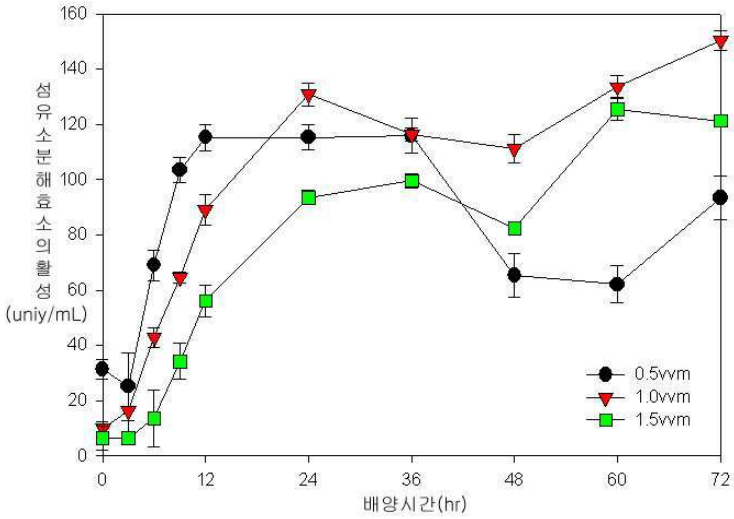
도면6


섬유소분해효소의활성
(unit/mL)
0
50
100
150
200
8.2
7.8
7.3
6.8
6.3
5.8
최초pH
30
37
40
온도
(℃)

도면7


섬유소분해효소의활성
(unit/mL)
배양시간(hr)
200rpm
300rpm
400rpm

도면8


섬유소분해효소의활성
(uniy/mL)
배양시간(hr)
0.5vvm
1.0vvm
1.5vvm