

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2012-0103022 (43) 공개일자 2012년09월19일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 1/14 (2006.01) C12P 7/06 (2006.01) C12R 1/72 (2006.01)	(71) 출원인 인하대학교 산학협력단 인천광역시 남구 인하로 100, 인하대학교 (용현동)	
(21) 출원번호 10-2011-0021005 (22) 출원일자 2011년03월09일 심사청구일자 2011년03월09일	(72) 발명자 이재화 경상남도 김해시 장유면 율하3로 76, 중앙하이츠 아파트 808동 1002호 이철균 서울특별시 서초구 신반포로 270, 104동 801호 (반포동, 반포자이아파트) 이성목 부산광역시 동구 진성로47번길 16 (수정동)	
	(74) 대리인 특허법인 천지	

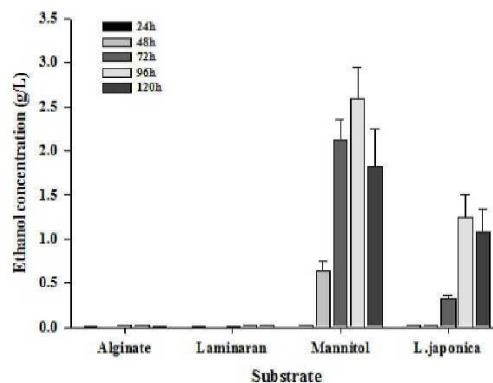
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 **에탄올 생성능을 가진 칸디다 속 균주**

(57) 요약

본 발명은 다시마 및 만니톨로 이루어진 균 중에서 선택된 1종 이상으로부터 에탄올을 생성할 수 있는 칸디다 속 균주(*Candida* sp.), 상기 선별된 칸디다 속 균주로부터 제조한 갈조류로부터 에탄올을 생성할 수 있는 생촉매 및 상기 칸디다 속 균주를 이용하여 혐기적 조건에서 갈조류로부터 에탄올을 제조하는 방법에 관한 것으로, 특히 상기 칸디다 속 균주는 혐기적 조건에서 갈조류로부터 에탄올을 현저하게 우수한 수율로 생성할 수 있으므로, 상기 칸디다 속 균주 및 상기 생촉매를 이용할 경우 갈조류로부터 바이오매스 에너지, 구체적으로 바이오에탄올을 생산할 수 있어 산업적으로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도6b



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 lusitanae* LJH4 KCTC 11817BP).

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 칸디다 루시타니에 LJH4 균주는 혐기성 조건에서 에탄올을 생성하는 것인 칸디다 루시타니에 LJH4 균주 KCTC 11817BP(*Candida lusitanae* LJH4 KCTC 11817BP).

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 칸디다 루시타니에 LJH4 균주는 서열번호 3의 염기서열을 갖는 것인 칸디다 루시타니에 LJH4 균주 KCTC 11817BP(*Candida lusitanae* LJH4 KCTC 11817BP).

청구항 4

제1항의 균주, 상기 균주의 배양액 및 상기 배양액의 농축액으로 이루어진 균에서 선택된 1종 이상을 포함하는 갈조류로부터 에탄올을 생산할 수 있는 생촉매(biocatalyst).

청구항 5

제4항의 갈조류로부터 에탄올을 생성할 수 있는 생촉매를 혐기성 조건에서 갈조류와 반응시키는 단계를 포함하는 바이오 에탄올의 생산방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 다시마 및 만니톨로 이루어진 균 중에서 선택된 1종 이상으로부터 에탄올을 생성할 수 있는 칸디다 속(*Candida* sp.) 균주에 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 에너지를 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 전환하는 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 활용도도가 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 해조류로부터 에탄올을 생성할 수 있는 신규한 미생물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0014] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 해조류로부터 에탄올을 생성할 수 있는 균주를 제공한다. 보다 구체적으로, 본 발명은 다시마 및 만니톨로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상으로부터 에탄올을 생성할 수 있는 칸디다 루시타니에 LJH4 균주(*Candida lusitaniae* LJH4)를 제공한다.
- [0015] 또한, 본 발명은 상기 칸디다 루시타니에 LJH4 균주(*Candida lusitaniae* LJH4), 상기 균주의 배양액 및 상기 배양액의 농축액으로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 해조류, 바람직하게는 갈조류, 더욱 바람직하게는 다시마 및 만니톨로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상으로부터 에탄올을 생성할 수 있는 생촉매(biocatalyst)를 제공한다.
- [0016] 또한, 본 발명은 상기 다시마 및 만니톨로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상으로부터 에탄올을 생성할 수 있는 생촉매를 해조류, 바람직하게는 갈조류, 더욱 바람직하게는 다시마와 반응시키는 단계를 포함하는 바이오에탄올의 제조방법을 제공한다.
- [0017] 본 발명자들은 대한민국 부산지역 막걸리 제조장에서 입수한 누룩으로부터 분리되고, 다시마 및 만니톨로 이루

어진 균 중에서 선택된 1종 이상으로부터 에탄올을 생성할 수 있으며, 혐기성 조건에서 다른 균주에 비하여 갈조류, 보다 구체적으로 다시마로부터 우수한 활성으로 에탄올을 생성할 수 있는 균주를 선별하여, 본 발명을 완성하였다.

[0018] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0019] 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.

[0020] 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 희게 분상으로 석출된다.

[0021] 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 일본 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.

[0022] 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.

[0023] 본 발명에 있어서, 만니톨($C_6H_{14}O_6$)이란 헥소오스에서 유래하는 당알코올의 일종 즉, 헥시톨의 일종으로 만니트(mannite)라고도 한다. 상기 만니톨 중 D-만니톨은 D-소르비톨 또는 들시톨(dulcitol)과 유사한 대표적인 당알코올로 D-만노오스 또는 D-프럭토오스의 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, 삼투압이뇨제 등의 의약품에도 많이 이용된다.

[0024] 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.

[0025] 일 측면에서, 본 발명은 해조류로부터 에탄올을 생성할 수 있는 균주에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명의 균주는 다시마 및 만니톨로 이루어진 균 중에서 선택된 1종 이상으로부터 에탄올을 생성할 수 있는 칸디다

루시타니아에 LJH4 균주(*Candida lusitaniae* LJH4)일 수 있다.

- [0026] 상기 칸디다 루시타니아에 LJH4 균주는 대한민국 부산지역 막걸리 제조장에서 입수한 누룩으로부터 분리된 것으로, 다시마 및 만니톨로 이루어진 균 중에서 선택된 1종 이상으로부터 에탄올을 생성할 수 있으며, 호기적 조건에 비하여 혐기적 조건에서 현저하게 우수한 에탄올 생성능을 가지고, 18S rDNA 염기서열 분석결과 상기 도 2 및 서열번호 3의 서열을 갖는 즉, 상기 균주의 18S rDNA의 서열이 도 2 및 서열번호 3의 서열인 균주이다. 본 발명의 선별된 균주인 LJH4 균주는 도 3에 나타낸 바와 같이, 칸디다 루시타니아에 AF172262(*Candida lusitaniae* AF172262)와 높은 상동성을 나타내었으므로, 상기 LJH4 균주는 칸디다 루시타니아(*Candida lusitaniae*) 균주로 최종 동정되었고, 상기 LJH4 균주를 칸디다 루시타니아 LJH4(*Candida lusitaniae* LJH4) 균주로 명명하였다.
- [0027] 상기 칸디다 루시타니아에 LJH4 균주(*Candida lusitaniae* LJH4)로 명명된 본 발명의 균주는 대한민국 대전광역시 유성구 과학로 111번지 한국생명공학연구원(KRIBB)에 위치한 한국생명공학연구원 생물자원센터에 2010년 12월 10일자로 기탁하여 기탁번호 KCTC 11817BP를 부여받았다.
- [0028] 상기 칸디다 루시타니아에 LJH4 균주는 만니톨(mannitol), 알긴산(alginate) 및 라미나란(laminaran)를 이용할 수 있으며, 상기 칸디다 루시타니아에 LJH4 균주의 당대사능과 관련하여, 만니톨에 대한 당이용능이 가장 우수하고, 다시마 분쇄물이 첨가된 배지 즉, 다시마를 이용하여 기존 균주에 비하여 매우 우수한 효율로 에탄올을 생성하고, 만니톨로부터도 우수한 효율로 에탄올을 생성할 수 있는 것으로 확인되었다.
- [0029] 또한, 다른 측면에서 본 발명은 다시마 및 만니톨로 이루어진 균 중에서 선택된 1종 이상으로부터 에탄올을 생성할 수 있는 생촉매(biocatalyst)에 관한 것이다.
- [0030] 상기 다시마 및 만니톨로 이루어진 균 중에서 선택된 1종 이상으로부터 에탄올을 생성할 수 있는 생촉매는 상기 칸디다 루시타니아에 LJH4 균주(KCTC 11817BP), 상기 균주의 배양액 및 상기 배양액의 농축액으로 이루어진 균에서 선택된 1종 이상을 포함하는 것일 수 있다.
- [0031] 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.
- [0032] 상기 균주의 배양액이란 칸디다 루시타니아에 LJH4 균주(KCTC 11817BP)를 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 갈조류가 포함된 배지일 수 있다.
- [0033] 상기 배양액의 농축액이란 상기 균주의 배양액을 통상적인 방법으로 하여 농축한 것을 의미한다.
- [0034] 또한, 본 발명은 상기 다시마 및 만니톨로 이루어진 균 중에서 선택된 1종 이상으로부터 에탄올을 생성할 수 있는 생촉매를 이용하여 에탄올, 구체적으로 바이오 에탄올을 제조하는 제조방법에 관한 것이다.
- [0035] 상기 제조방법은 상기 다시마 및 만니톨로 이루어진 균 중에서 선택된 1종 이상으로부터 에탄올을 생성할 수 있는 생촉매를 해조류, 바람직하게는 갈조류, 더욱 바람직하게는 다시마와 반응시키는 단계를 포함하는 것일 수 있다.
- [0036] 상기 반응시키는 단계는 바람직하게는 혐기성 조건에서 수행할 수 있다. 또한, 상기 반응시키는 단계는 제조방법은 20 내지 35℃, 바람직하게는 25 내지 33℃에서 수행할 수 있고, 더욱 바람직하게는 27 내지 32℃에서 수행할 수 있다.
- [0037] 본 발명의 칸디다 루시타니아에 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 있어, 환경 및 경제적 측면에서 관련 산업에 크게 이바지할 수 있을 것으로 예상된다.

발명의 효과

[0038] 이상 살펴본 바와 같이, 본 발명에 따른 칸디다 루시타니에 LJH4 균주 KCTC 11817BP는 혐기성 조건에서 배양하는 경우, 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 있으므로, 환경 및 경제적 측면을 고려하면, 그 산업적 이용가치가 매우 크다고 할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0039] 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, 다시마가 첨가된 배지에서 에탄올 생성능이 우수한 것으로 확인된 LJH4의 염기서열 즉, LJH4의 18S rDNA 염기서열분석 결과이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른, 다시마가 첨가된 배지에서 에탄올 생성능이 우수한 것으로 확인된 LJH4의 18S rDNA의 염기서열을 기초로 한 다른 세균과의 계통발생론적 관계(Phylogenetic tree)를 나타내는 표이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른, 다시마가 첨가된 배지에서 에탄올 생성능이 우수한 것으로 확인된 LJH4와 누룩으로부터 분리한 다른 균주의 다시마로부터 에탄올 생성능을 확인한 그래프로, 도 4a는 혐기성 조건에서 배양한 결과이고, 도 4b는 호기성 조건에서 배양한 결과이다.

도 5는 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 5a는 *Candida lusitanae*(KCTC 7212)를 배양한 결과이고, 도 5b는 다시마가 첨가된 배지에서 에탄올 생성능이 우수한 것으로 확인된 LJH4를 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 에탄올 생성능을 비교한 그래프로, 도 6a는 *Candida lusitanae*(KCTC 7212)를 배양한 결과이고, 도 6b는 다시마가 첨가된 배지에서 에탄올 생성능이 우수한 것으로 확인된 LJH4를 배양한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0040] 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]

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

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.

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 측정된 결과를 도 1에 나타내었다. 상기 시간에 따른 에탄올 발생량을 측정된 결과를 도 1에 나타내었다.

[0045] 상기 도 1에서 나타낸 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.

[0046] 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.

[0047] 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.

[0048] 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.

[0049] <실시예 2> 다시마 및 만니톨로 이루어진 균 중에서 선택된 1종 이상으로부터 에탄올을 생성할 수 있는 해양 → 미생물의 동정

[0050] 상기 실시예 1에서 분리된 균주인 LJH1, LJH2, LJH3 및 LJH4의 동정은 16S rDNA 염기서열 또는 18S rDNA 염기서열의 분석을 통하여 수행하였다. 상기 16S 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 및 ITS1(서열번호 1))와 리버스 프라이머(Reverse Primer, 1492R 및 ITS4(서열번호 2))로 나타내었다.

표 1

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

표 2

Primers	서열(5'→3')	서열번호
ITS1	5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'	1
ITS4	5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'	2

[0053] 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 염기서열을 결정하였으며, LJH4의 염기서열에 대해 총 829 bp 염기서열을 결정하였고, 그 결과로 얻은 염기서열(서열번호 3)을 도 2에 나타내었다.

[0054] 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 정

보 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.

[0055] 도 3에 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.

[0056] 상기 칸디다 루시타니에 LJH4 균주는 대한민국 대전광역시 유성구 과학로 111번지 한국생명공학연구원(KRIBB)에 위치한 한국생명공학연구원 생물자원센터에 2010년 12월 10일자로 기탁하여 기탁번호 KCTC 11817BP를 부여받았다.

[0057] 또한, 상기 LJH1 균주는 엔테로박터 속 균주(*Enterobacter* sp.)로 동정되었고, 상기 LJH2 균주는 판토에아 아글로메란스(*Pantoea agglomerans*)로 동정되었으며, 상기 LJH3 균주는 에르위니아 타스메니엔시스 (*Erwinia tasmanienis*)로 동정되었다.

[0058] <실시예 3> 칸디다 루시타니에 LJH4 균주의 에탄올 생성능 확인

[0059] 실시예 3-1. 에탄올 생성능이 가장 우수한 균주의 확인

[0060] 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.

[0061] 각각의 균주의 배양조건 및 배양시간에 따른 에탄올 생성량을 측정하여 그 결과를 도 4에 나타내었다. 도 4a는 혐기성 조건에서 배양한 결과이고, 도 4b는 호기성 조건에서 배양한 결과이다.

[0062] 상기 도 4a에 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.

[0063] 상기 도 4b에 나타낸 바와 같이, 호기성 조건에서는 호기성 균주인 LJH1, LJH2 및 LJH3 균주가 혐기성 균주인 LJH4 균주 보다 에탄올생성능이 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.

[0064] 따라서, 상기 실시예 2에서 분리된 균주 중 LJH4 균주를 이용하여 혐기성 조건에서 갈조류 즉, 다시마가 포함된 배지에서 생산하는 것이 가장 최적 조건인 것으로 확인되었다.

[0065] 실시예 3-2. LJH4 균주의 활성 확인

[0066] 상기 에탄올 생성능이 가장 우수한 것으로 확인된 칸디다 루시타니에 LJH4 균주의 에탄올 생성능을 확인하기 위하여, 같은 속에 해당하는 미생물인 *Candida lusitaniae*(KCTC 7212)와 비교하여 생육 정도 및 에탄올 생성능을

확인하였다.

[0067] 상기 균주의 배양은 혐기적 조건에서 탄소원으로 상기 다시마 분쇄물(*L. japonica*), 알긴산(alginate, Sigma-Aldrich Co., USA), 라미나란(laminaran, Tokyo Kasei, J메루) 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)을 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.

[0068] 상기 생육정도를 측정한 결과를 도 5에 나타내고, 에탄올 생성능에 대한 측정 결과를 도 6에 나타내었다.

[0069] 상기 도 5에 나타난 바와 같이, 모든 기질 즉, 모든 종류의 배지에서 공지균주인 *Candida lusitanae*(KCTC 7212, 도 5a)에 비하여 칸디다 루시타니에 LJH4 균주(도 5b)의 생육정도가 더 우수한 것으로 확인되었다. 특히, 만티톨이 첨가된 배지의 경우에는 루시타니에 LJH4 균주는 *Candida lusitanae*(KCTC 7212)에 비하여 약 25% 정도 더 우수한 생육정도를 나타내었다.

[0070] 또한, 상기 도 6에 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 6a)에 비하여 칸디다 루시타니에 LJH4 균주(도 6b)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.

[0071] 상기와 같은 결과에 의할 때, 본 발명인 칸디다 루시타니에 LJH4 균주는 갈조류와 같이 만니톨이 풍부한 해조류에 대해서 다른 균주에 비하여 현저하게 우수한 에탄올 생성능을 가지므로, 육상생물과 달리 식량으로 이용되는 등 식용으로 이용되는 비율이 낮아 경쟁력을 가지나, 다양한 탄소원 구성에도 불구하고, 육상 생물에 비하여 에탄올 생성능 즉, 에탄올 전환율이 낮은 단점으로 인해 바이오 에너지원 즉, 바이오매스로 이용이 제한되었던 해조류, 구체적으로 만니톨이 풍부한 갈조류의 이용 가능성을 현저하게 개선하여 화석연료를 대체할 수 있는 대체 연료인 바이오 에너지 생산에 이바지할 수 있으므로, 상기 균주는 경제적인 측면뿐만 아니라 환경적인 측면에서도 매우 유용한 것으로 평가된다.

수탁번호

[0072]

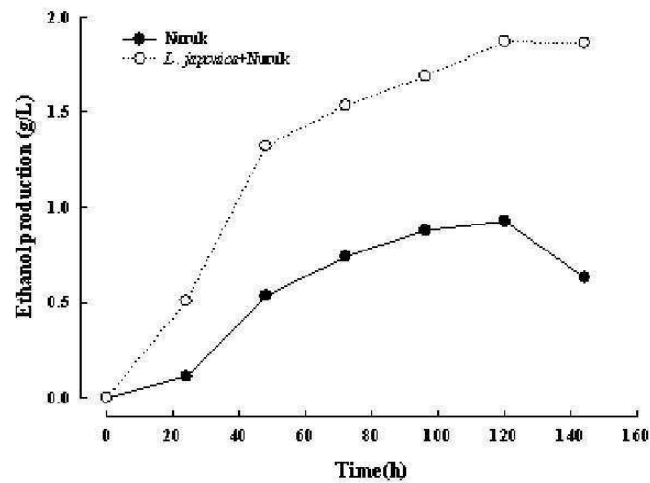
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC11817BP

수탁일자 : 20101130

도면

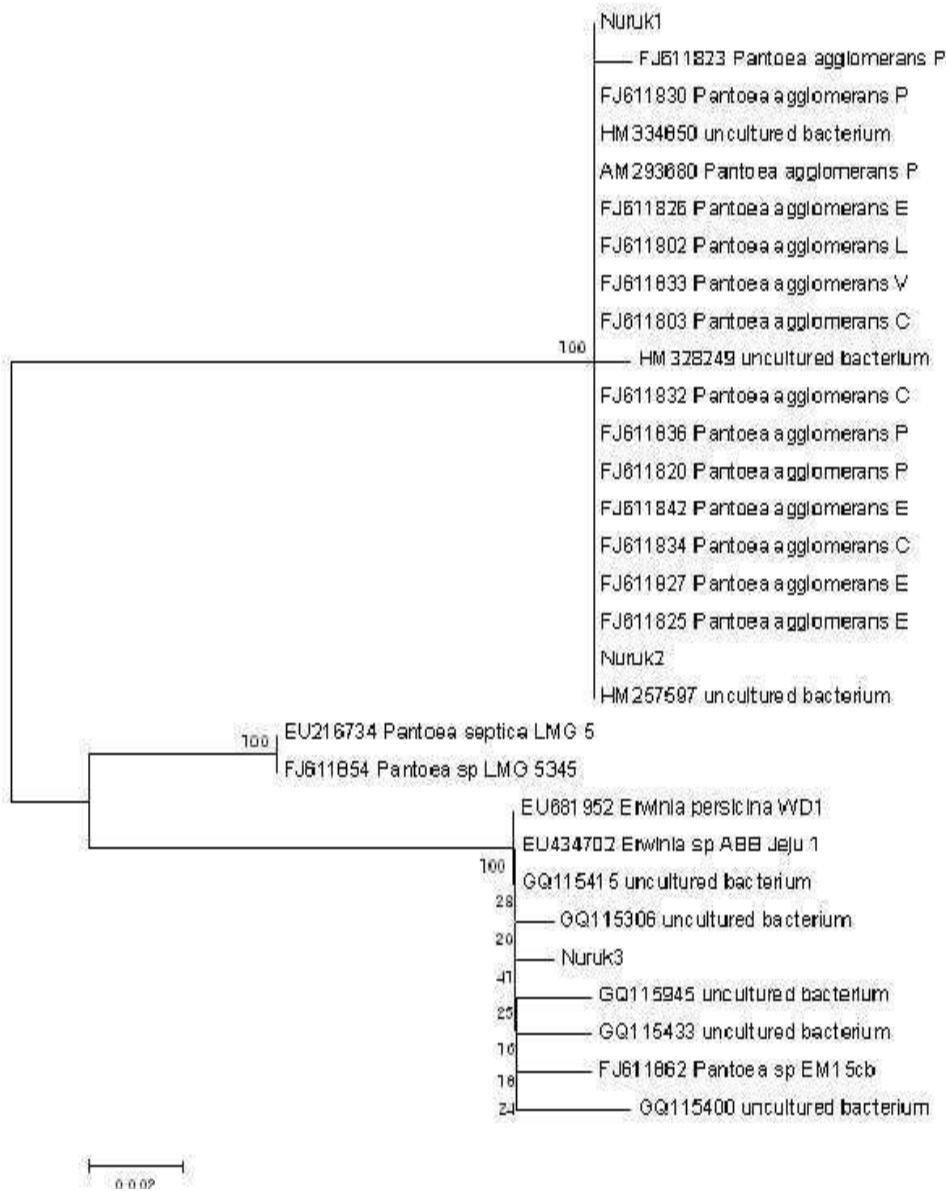
도면1



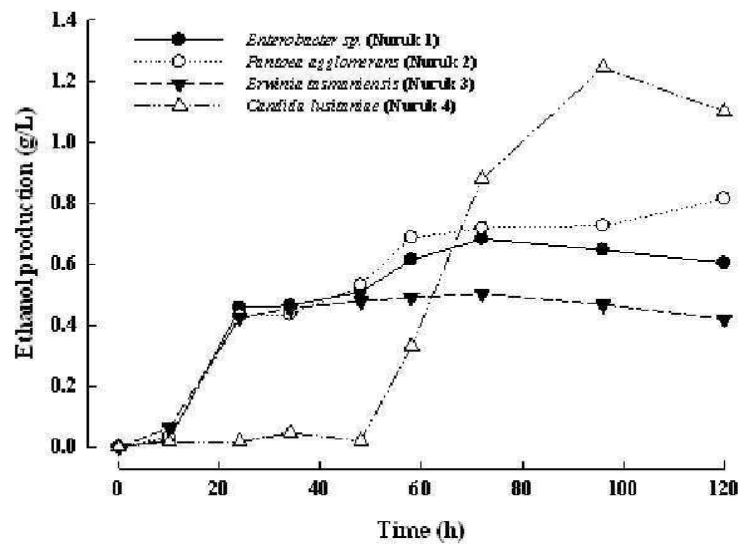
도면2

ACCTCGGAAGGATCATTAATAATACAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCGCA
 TTTTATTCGAATTTCTTAATATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCGCA
 TOGATGAAGAAGCAGCGAATTCGGATACGTAGTATGACTTCGAGACGTGAATCATCGAA
 TCTTTGAACGCACATTTGGGCTCGAGGCATTCCTCGAGGCATGCTGTCTTGAGCGTCGCA
 TCCCTCTAACCOCGGTTAGGGGTTGCTCCGAAATATCAACCGGCTGTCAACACGTT
 TACAGCAGGACATTTGGGCTCAAAATCAGGTAGGACTACCGCTGAACCTAAGCATATCA
 ATAGTCGGAGGAAAAGGATCATTAATAATACAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTC
 ATAAATTTTATTCGAATTTCTTAATATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTC
 TOGCATGATAAGAAGCAGCGAATTCGGATACGTAGTATGACTTCGAGACGTGAATCATCG
 AATCTTTGAACGCACATTTGGGCTCGAGGCATTTGNGAGGCATGCTGTCTTGAGCNC
 CACCCCTCTAACCOCGGTANGGNTTGTCCCAAATATCAACGGGTTTCAAAAANTTT
 TINGNAAAAGATTTGTCCCCCNNAANGGGGGGACACCCCCNAAATANAAAAAN
 TTTTGGGGGGAAAAGAAAACCTNNTTAATCTGANTTNAAAAGCCGNCGGAAATAATNT
 GANCTTTCACATCTNTAACCTTNCINAACNTGTTCNTNGATTNGGAN

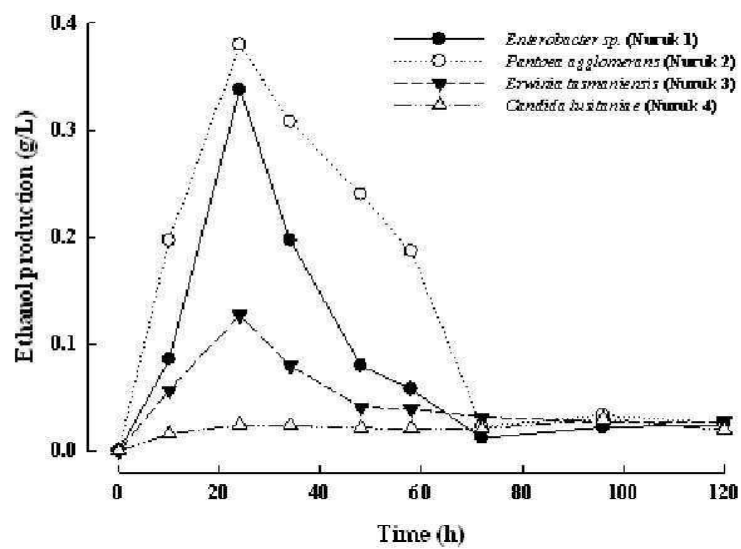
도면3



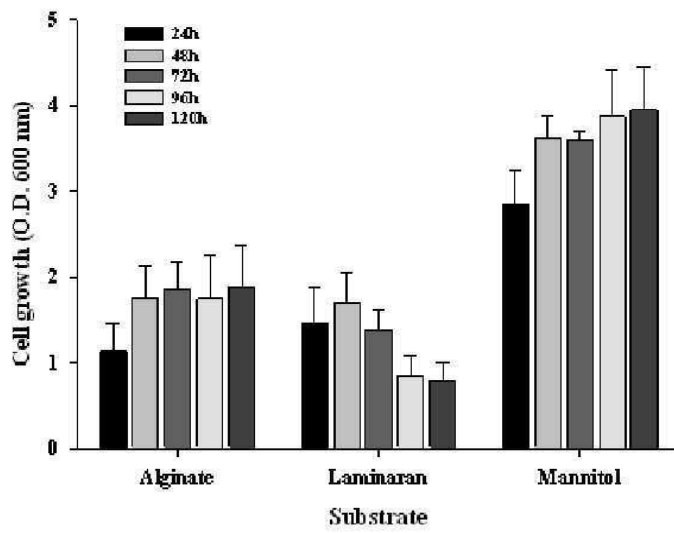
도면4a



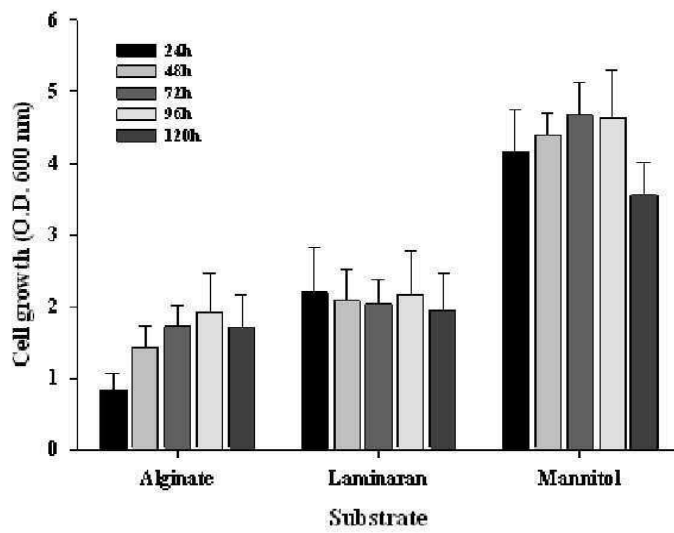
도면4b



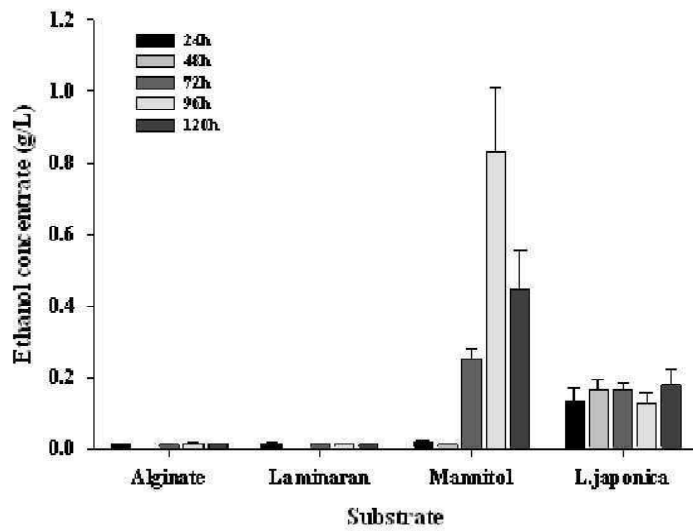
도면5a



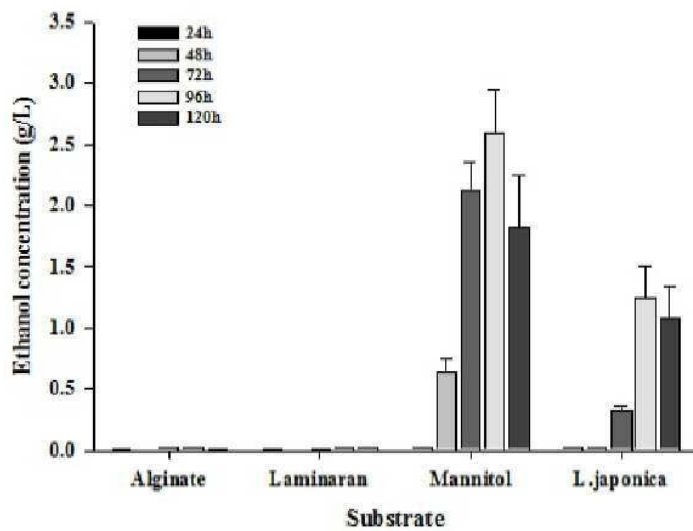
도면5b



도면6a



도면6b



서열목록

- <110> INHA Industry Partnership Institute
- <120> STRAIN OF CANDIDA SP. HAVING A ETHANOL-PRODUCING ACTIVITY
- <130> KP20100423
- <160> 3
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1
- <211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ITS1

<400> 1

tccgtaggtg aacctgcgg 19

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ITS4

<400> 2

tcctccgctt attgatatgc 20

<210> 3

<211> 829

<212> DNA

<213> Candida lusitaniae LJG4

<400> 3

acctgcggaa ggatcattaa aaaatacatt acacattggt tttgcgaaca aaaaaataaa 60

tttttttatt cgaatttctt aatatcaaaa ctttcaacaa cggatctctt ggttctcgca 120

tcgatgaaga acgcagcgaa ttgcgatacg tagtatgact tgcagacgtg aatcatcgaa 180

tctttgaacg cacattgcgc ctgcaggcat tcctcgaggc atgcctgttt gagcgtcgca 240

tcccccttaa cccccggta ggctgtgctc cgaatatca accgcgtgt caaacacgtt 300

tacagcacga catttcgccc tcaaatcagg taggactacc cgctgaactt aagcatatca 360

atagtcggag gaaaaggatc attaaaaaat acattacaca ttgtttttgc gaacaaaaaa 420

ataaatTTTT ttattcgaat ttcttaatat caaaacttcc aacaacggat ctcttggttc 480

tcgcatcgat aagaacgcag cgaatgcgat acgtagtaga cttgcagacg tgaatcatcg 540

aatctttgaa cgcacattgc gcctcgaggc atttcnngag gcatgctgtt tngagcnccc 600

caccctcta cccccggta ngcnttgctc ccaaatatca cngcgggttt caaaaanttt 660

ttngnaaaaa gatTTTgtcc ccccnnaan gggggggaca ccccccnnaa atanaaaaa 720

tntttggggg ggaaaagaaa acctnnttaa tctgantnn aaagccgncg gaaataatnt 780

ganctttcac attctntaac cctnctnaac ntgttcctn gatnngan 829