



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년07월22일
(11) 등록번호 10-2002254
(24) 등록일자 2019년07월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 7/62 (2006.01) C08G 63/06 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12P 7/625 (2013.01)
C08G 63/06 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0050633
(22) 출원일자 2018년05월02일
심사청구일자 2018년05월02일
(56) 선행기술조사문헌
Applied and Environmental Microbiology, Vol.
77, pp. 2847-2854 (2011.)*
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
건국대학교 산학협력단
서울특별시 광진구 능동로 120, 건국대학교내 (화양동)
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
양영현
서울특별시 송파구 가락로 187, 30동 207호 (송파동, 한양아파트)
홍윤기
경기도 안산시 단원구 안산천남로 211, 109동 1403호 (고잔동, 보네르빌리자아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인이름리온

전체 청구항 수 : 총 4 항

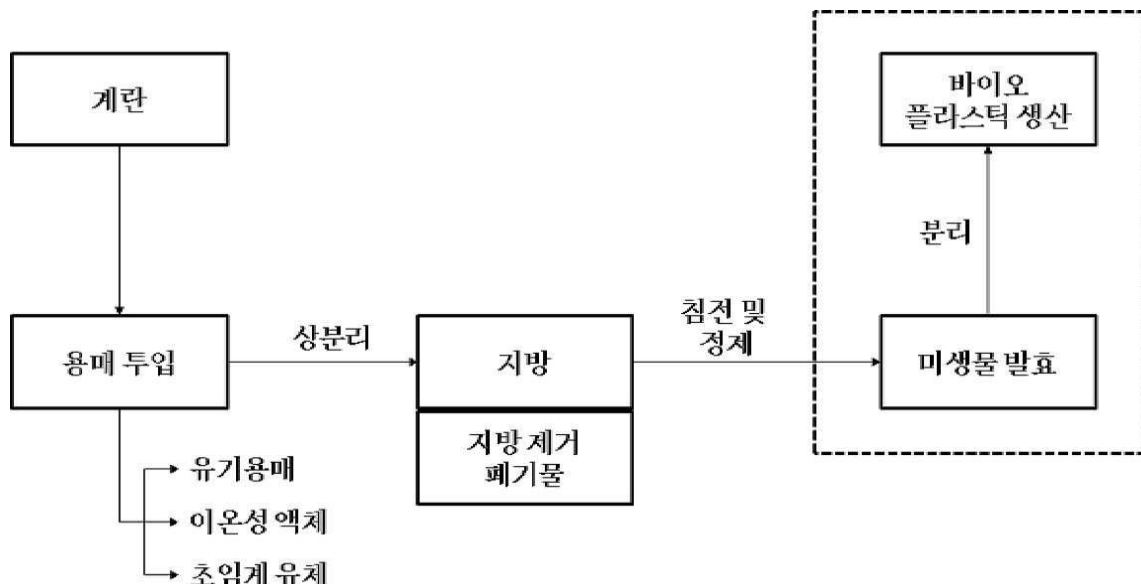
심사관 : 황상필

(54) 발명의 명칭 계란 노른자에서 추출한 지방성분을 이용한 Poly(HB-co-HHx) 생산 방법

(57) 요약

본 발명은 계란 폐기물에서 추출한 지방을 주 탄소원으로 활용한 P(HB-co-HHx) 생산 방법에 관한 것으로서, 본 발명의 P(HB-co-HHx) 생산 방법에 의하면 버려지는 폐 계란으로부터 고부가가치의 바이오플라스틱을 생산할 수 있으며, 추출된 소량의 지방성분을 대량 배양의 미생물 공정을 통하여 수배에서 수십배의 생산 증대 효과를 기할 수 있을 뿐 아니라 살충제가 검출되어 버려지는 계란을 재활용하여 응용함으로써 폐기물 감소에 따른 환경보호와 바이오 소재의 생산에 따른 대체 소재의 이용에 따라 우수한 경제적 효과를 가져올 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

전종민

서울특별시 성북구 솔샘로25길 28, 101동 1002호
(정릉동, 정릉풍림아이원아파트)

송헌석

서울특별시 광진구 광나루로 440, 105호 (화양동)

김재석

서울특별시 송파구 올림픽로4길 42, 3동 606호(잠실동, 우성아파트)

홍주원

서울특별시 강남구 압구정로 113, 25동 906호 (압구정동, 미성아파트)

샤시 칸트 바티아

서울특별시 광진구 능동로 120, 공대 C동 484-1 (화양동)

박기수

서울특별시 광진구 아차산로 229, 한림타워 15층 1521호(화양동)

문유미

서울특별시 광진구 군자로 43, 810호(화양동)

김형주

서울특별시 강남구 역삼로25길 16-4, 동광빌라 201(역삼동)

이상현

경기도 성남시 분당구 불정로 119, 801동 302호(정자동, 정든마을한진8단지아파트)

김현중

서울특별시 노원구 섭발로 139, 111동 202호 (공릉동, 공릉풍림아파트)

(56) 선행기술조사문헌

Bioprocess Biosyst. Eng., Vol. 41, pp. 229-235 (2017.11.09.)

KR1020160083470 A

Appl. Microbiol. Biotechnol., Vol. 98, pp. 5461-5469 (2014.)

Appl. Microbiol. Biotechnol., Vol. 87, pp. 2037-2045 (2010.06.10.)

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2015M1A5A1037196

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 거대과학연구개발사업(해양극지기초원천기술개발)

연구과제명 [단독][EZbaro](2단계1차)해양유래 고효율 hydrolase를 가진 한국형 내염 박테리아 연구

기 여 율 1/2

주관기관 건국대학교

연구기간 2017.07.01 ~ 2018.04.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017M3A9E4077234

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 바이오.의료기술개발사업

연구과제명 [단독][EZbaro](1단계1차)다제내성 황색 포도구균 신규 독성/내성 조절 인자 연구

기 여 율 1/2

주관기관 건국대학교

연구기간 2017.09.01 ~ 2018.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

계란을 분쇄한 후 용매를 가하여 지방을 분리하는 단계(S1);

랄스토니아 균주를 전 배양하는 단계(S2);

단계 (S2)에서 전 배양한 랄스토니아 균주를 단계 (S1)에서 분리한 지방을 탄소원으로 포함하고, 질소원으로 암모늄 니트레이트를 포함하는 배양액에서 배양하는 단계(S3);

단계(S3)에서 배양한 균주로부터 P(HB-co-HHx)를 분리 및 정제하는 단계(S4);를 포함하고,

상기 단계 (S3)의 배양액은 단계 (S1)에서 분리한 지방을 전체 배양액에 대해 5 내지 10.0 %(w/v)의 농도로 포함하는, P(HB-co-HHx)[poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate)]의 생산 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 랄스토니아 균주는 랄스토니아 유포로파(*Ralstonia eutropha*) RE2133 인, 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

단계 (S2)의 배양은 랄스토니아 균주를 1 ~ 3일 동안 25 ~ 35℃, 100 ~ 300 rpm에서 배양하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 배양액은 탄소원과 질소원을 20:1 ~ 40:1의 비율(w/v)로 포함하는, 방법.

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 미생물을 이용한 계란 폐기물 유래 지방 성분으로부터 바이오플라스틱을 생산하는 방법에 관한 것으로, 버려지는 폐 계란에서 얻은 지방성분을 탄소원으로 하여 미생물을 배양하고 이로부터 P(HB-co-HHx)를 생산하는 방법에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0003] 계란은 저렴한 양질의 단백질 공급원으로, 단백질뿐만 아니라 불포화지방산, 비타민, 레시틴 등의 영양소를 지니고 있어 국민 건강유지에 필수적인 식품이다. 농림축산식품부의 2016년 통계자료에 따르면, 우리나라의 계란 생산·소비량은 135억5천600만개이며, 1인당 소비량은 연간 268개이다. 하지만 최근에 일부 농가에서 진드기 구제를 위해 살충제를 사용한 사실이 적발되면서 계란 소매가격이 크게 급락하고 소비자들은 불안에 떨며 양심적인 대다수의 농가들은 큰 피해를 보게 되었다. 당시 39만 8000개의 계란이 폐기 처분되며 이에 대한 처리문제가 대두되게 되었다.
- [0004] 2017년 계란 파동 당시 검출되어 문제가 된 살충제로는 비펜트린, 피프로닐, DDT 등이 있다. 비펜트린은 피레스트로이드 계열의 살충제로 국화류에 존재하는 살충 성분이며 곤충에 대한 독성은 강하지만 닭이나 사람에 대한 독성은 거의 없다. 피프로닐은 신경전달 물질인 GABA 수용기를 차단하기 때문에, 사람이 과 용량 섭취 시 두통, 구토 및 팔다리 떨림 등의 증상이 나타날 수 있다. DDT(Dichlorodiphenyltrichloroethane)는 80년대 이전에 단종되어 사용되지 않은 농약이지만 '친환경 농장'에서 키운 닭들에게서 일부 검출되었으며 생물 농축에 의해 검출된 것으로 추측되고 있다.
- [0005] 상기 살충제들은 잔류기간이 수년이상 되기 때문에 단순 매립방식으로 처리할 경우 지하수에 살충 성분들이 스며들거나 빗물에 의해 다른 곳으로 유출되어 2차 피해를 야기할 우려가 있다. 따라서 살충제가 검출되어 폐기되는 계란은 현재 전문 처리업체에서 169도의 고온에서 1시간 10분간 간접 가열하여 살충제 성분을 분해 시키고 다이옥신 등의 대기 오염물질 및 탄소 방출을 최소화 하는 방식으로 처리되고 있다.
- [0006] 난류에서 추출된 오일을 이용한 제품 생산에 대한 기술은 천연 비누 생산이나 식품 및 건강기능 식품 원료의 생산에 대한 분야에 그치고 있어 살충제로 폐기되는 계란들을 이용하는 데 한계가 있다. 폐기처분 되는 계란들은 그 영양적 가치가 높은 수준임에도 불구하고 전량 소각되고 있다.
- [0007] 따라서 매년 폐기되는 계란들로 인한 자원 손실을 최소화 하는 동시에 농가에서 폐기되고 있는 계란을 친환경적으로 처분하며 가치 있는 제품 생산의 원료로 사용할 수 있는 방안에 대한 연구가 필요한 실정이다. 또한, 계란에서 추출된 난황유의 주 성분은 올레인산 및 리놀렌산 등 탄소 길이가 긴 지방산이기에 이를 효율적으로 활용할 수 있는 기술 역시 연구가 필요하다.
- [0008] 또한 미생물 유래 바이오 플라스틱인 폴리하이드록시알카노에이트 (Polyhydroxyalkanoate) 중에 물성이 우수한 P(HB-co-HHx)의 경우 HHx의 단량체의 생산을 위해서 배양 중에 사슬길이가 긴 (C>5)의 전구체를 넣어주는 경우가 많은데, 기존에는 전구체를 Palm oil 등과 같은 수요가 높은 지방산을 활용하는 경우가 많아서, 그 대체제의 필요성이 있었다.
- [0009] 이에, 본 발명자들은 계란으로부터 용매 추출법을 이용하여 분리, 정제하여 얻어진 지방 성분을 기질로 하여 미생물을 배양함으로써 바이오플라스틱(P(HB-co-HHx))을 효과적으로 생산할 수 있음을 확인하고 폐기 처분되는 계란의 재활용을 위한 응용 방법을 제공할 수 있음을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명의 목적은 폐기 처분되는 계란으로부터 지방 성분을 분리 및 정제한 후, 상기 지방 성분을 기질로 하는 미생물을 배양하여 바이오플라스틱, P(HB-co-HHx)으로의 화학적 변환이 가능한 지질을 생산하는 공정 및 이를 이용한 P(HB-co-HHx) 생산 방법을 제공하는 것이다.
- [0012] 폐 계란에서 분리한 지방 성분과 알스토티아 균주를 이용하였을 경우 버려지는 폐기물을 사용하여 3HHx 함량이 높은 P(HB-co-HHx)를 얻을 수 있을 뿐 아니라 시간 및 비용감소를 이끌어 낼 수 있다.

과제의 해결 수단

- [0014] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 폐 계란에서 수득한 지방성분을 탄소원으로 이용하여, 알스토티아 균주로부터 3HHx(3-hydroxy hexanoate)를 포함하는 P(HB-co-HHx)[poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate)]의 생산 방법을 제공한다.
- [0015] 또한, 본 발명은 본 발명의 방법들로 제조된 3HHx 함량이 높은 P(HB-co-HHx)를 제공한다.

발명의 효과

- [0017] 본 발명은 폐 계란에서 추출한 지방성분을 주 탄소원 또는 부 탄소원으로 활용한 P(HB-co-HHx) 생산 방법에 관한 것으로서, 버려지는 계란 폐기물로부터 바이오플라스틱의 물성을 향상시킬 수 있는, 3HHx를 고 함량으로 포함하는 P(HB-co-HHx)를 대량 생산할 수 있다.
- [0018] 또한, 추출된 소량의 지방성분을 대량 배양의 미생물 공정을 통하여 수배에서 수집 배의 생산 증대 효과를 기할 수 있으며, 추출 이후 잘 확립된 미생물 공정을 통하여 보다 친환경적인 공정을 도입할 수 있어 이를 활용한 폐자원화 기술의 활용성을 크게 증진시키는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [0020] 도 1은 계란으로부터 P(HB-co-HHx)를 생산하는 개략도를 나타낸 도면이다.
- 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 계란으로부터 P(HB-co-HHx)를 생산하는 공정을 나타낸 도면이다.
- 도 3은 계란에서 분리한 지방을 탄소원으로 하여 생산된 바이오플라스틱을 GC(Gas chromatography)로 분석한 결과이다.
- 도 4는 계란에서 분리한 오일을 탄소원으로 사용하여 랄스토니아 균주로부터 바이오 플라스틱을 생산한 결과를 GC(Gas chromatography)로 분석한 그래프로서, A는 오일 첨가량에 따른 세포성장(CDW, cell dry weight)(g/L)과 폴리 하이드록시 알카노에이트(PHA)의 생산량(%)을 분석한 그래프이고, B는 오일 첨가량에 따른 폴리 하이드록시 뷰티레이트(PHB)의 생산량(%) 및 그 중 3-HHx 함량을 분석한 그래프이다.
- 도 5는 질소원의 종류를 달리하여 바이오 플라스틱을 생산한 결과로서, A는 세포성장(CDW, cell dry weight)(g/L)과 폴리 하이드록시 알카노에이트(PHA)의 생산량(%)을 분석한 그래프이고, B는 폴리 하이드록시 뷰티레이트(PHB)의 생산량(%) 및 그 중 3-HHx 함량을 분석한 그래프이다.
- 도 6는 탄소원과 질소원의 비율(w/v)을 달리하여 바이오 플라스틱을 생산한 결과로서, A는 세포성장(CDW, cell dry weight)(g/L)과 폴리 하이드록시 알카노에이트(PHA)의 생산량(%)을 분석한 그래프이고, B는 폴리 하이드록시 뷰티레이트(PHB)의 생산량(%) 및 그 중 3-HHx 함량을 분석한 그래프이다.
- 도 7은 본 발명에서 사용한 지방성분 분리 장치의 구성을 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0021] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0022] 본 발명은 계란 폐기물로부터 수득한 지방을 주 탄소원 또는 부 탄소원으로 이용하여 랄스토니아 균주로부터 3HHx(3-hydroxy hexanoate)를 포함하는 P(HB-co-HHx)[poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate)]를 생산하는 방법에 관한 것이다.
- [0023] 본 발명의 P(HB-co-HHx)의 생산 방법은 구체적으로 아래의 단계를 포함한다.
- [0024] 계란을 분쇄한 후 용매를 가하여 지방을 분리하는 단계(S1);
- [0025] 랄스토니아 균주를 전 배양하는 단계(S2);
- [0026] 상기 단계 (S2)에서 전 배양한 랄스토니아 균주를 단계 (S1)에서 분리한 지방을 포함한 배양액에 배양하는 단계 (S3);
- [0027] 상기 단계(S3)에서 배양한 균주로부터 P(HB-co-HHx)를 분리 및 정제하는 단계(S4).
- [0028] 본 발명의 P(HB-co-HHx) 생산 방법에 있어서, 단계 (S1)의 계란은 계란 가공 공장 및 축산 농가에서 살충제가 검출되어 버려지는 계란을 사용할 수 있고, 계란을 포함한 모든 난류에 대해 적용이 가능하다.
- [0029] 본 발명의 P(HB-co-HHx)의 생산 방법에 있어서, 단계 (S2)의 랄스토니아(*Ralstonia*) 균주는 개량형 균주인 랄스토니아 유티로파(*Ralstonia eutropha* RE2133)인 것이 P(HB-co-HHx) 생산에 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 랄스토니아 유티로파 균주는 당과 독성물질에 내성을 갖고 폐기물에서 추출되는 지방을 사용하여 바이오 플라스틱 물질인 3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate(P(HB-co-HHx)) 또는 폴리-하이드록시 알카노에이트(poly-hydroxy alkanoate, PHA) 형태의 물질인 트리아실글리세롤(triacylglycerols)을 생산할 수 있다.

- [0030] 본 발명의 P(HB-co-HHx)의 생산 방법에 있어서, 상기 단계 (S3)의 배양은 탄소원이 포함된 배지에서, 1 ~ 3일 동안 25 ~ 35℃, 100 ~ 300 rpm에서 배양하는 것이 바람직하고, 1일 동안 30℃, 200 rpm에서 배양하는 것이 더욱 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0031] 본 발명의 P(HB-co-HHx)의 생산 방법에 있어서, 상기 단계 (S3)의 배양액은 단계(S1)에서 분리한 지방을 탄소원으로 포함하고, 암모늄 셀페이트, 암모늄 클로라이드 및 암모늄 니트레이트로 이루어진 군에서 선택되는 질소원을 포함할 수 있다.
- [0032] 본 발명의 바람직한 일 실시예에 의하면, 상기 배양액은 단계 (S1)에서 분리한 지방을 단독 탄소원으로 사용할 수 있고, 이 경우 전체 배양액에 대하여 0.5 내지 10.0 %(w/v)의 농도로 포함하는 것이 바람직하고, 보다 바람직하게는 0.5 ~ 5 %(w/v)의 농도로 포함할 수 있으며, 가장 바람직하게는 5%(w/v)의 농도로 포함할 수 있다.
- [0033] 지방의 함량에 따라 0.5~10%(w/v)까지 PHB 와 HHx 비율 및 세포 성장에 큰 차이를 보이지 않았으나, 지방의 농도가 증가할 수록 PHA 함량이 증가하기 때문에 상기 지방의 함량은 0.5~5%(w/v)으로 함이 적당하다.
- [0034] 본 발명의 바람직한 일 실시예에 의하면, 상기 배양액은 탄소원과 질소원을 5:1 ~ 80:1의 비율(w/v)로 포함할 수 있고, 20:1 ~ 40:1의 비율(w/v)로 포함할 수 있으며, 상기 계란 폐기물에서 수득한 지방을 탄소원으로 하는 최적화된 랄스토니아 최소 배지에서 탄소원과 질소원의 비율이 20:1인 것이 PHA 총 생산량이 가장 높기에 바람직하며, 질소원 역시 PHA 총 생산량이 가장 높은 암모늄 니트레이드가 가장 바람직하다.
- [0035] 본 발명의 P(HB-co-HHx)의 생산 방법에 있어서, 상기 단계 (S4)의 분리는 원심분리를 이용할 수 있으며, 3000 내지 5000 rpm에서 20분 내지 40분 동안 원심분리 하여 분리하는 것이 바람직하며, 4000 rpm, 30분 동안 원심분리 하여 분리하는 것이 더욱 바람직하다.
- [0036] 본 발명의 P(HB-co-HHx)의 생산 방법에 있어서, 상기 단계 (S4)의 P(HB-co-HHx)의 생산은 획득한 지질 성분을 랄스토니아 등의 균주가 성장 및 바이오플라스틱 생산을 위하여 분해하여 짧은 직쇄 알칸(3-hydroxy butyrate) 및 이보다 탄소 길이가 두 개 더 긴 직쇄 알칸(3-hydroxy hexanoate)를 생성시키고 이를 다시 세포 내에서 중합하는 단계로서, 크게 3가지 효소(β -ketothiolase, (R)-specific enoyl coenzyme-A hydratase, PHA synthase)의 작용을 통해 바이오플라스틱으로서 유용한 고분자 물질인 P(HB-co-HHx)를 산출할 수 있다.
- [0038] 다른 측면에서, 본 발명은 상기 P(HB-co-HHx)의 생산 방법으로 제조된 P(HB-co-HHx)를 제공한다.
- [0039] 본 발명의 방법에 의하면, 폐 계란으로부터 3HHx 함량이 높은 P(HB-co-HHx)를 생산할 수 있고, 상기 3HHx는 P(HB-co-HHx)에 대해 30 내지 60 % 함량으로 포함될 수 있다.
- [0041] 이하에서는 바람직한 실시예를 들어 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이에 의하여 제한되지 않는다는 것은 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 자명할 것이다.
- [0043] **실시예 1. 계란 폐기물로부터 지방의 분리**
- [0044] 건국대학교 내의 제2학생회관 지하1층에 있는 식당에서 유통기한이 지나 버려지는 1 kg 계란 폐기물을 수집하였다. 상기 계란 폐기물을 가정에서 흔히 사용하는 믹서기로 파쇄한 후, 상술한 장치에 넣고 이소프로판올과 헥산 혼합 유기용매를 사용하여 500 g 내외의 지방을 분리하였다.
- [0046] **실시예 2. 계란에서 분리한 지방을 이용한 랄스토니아 균주 배양 및 P(HB-co-HHx)의 생산**
- [0047] **2-1. 균주의 배양 및 수거**
- [0048] 랄스토니아 유티로파 균주(Re2133)를 3 mL의 TSB(Tryptone Soy Broth)에 30℃, 24시간 전 배양 한 후 배양액을 2번 원심분리 및 세척한 후 300 μ L 정도의 물을 넣어 볼텍싱(vortexing) 하였다. 5% 식물유를 탄소원으로 하여 최소배지 50 mL에 접종 후 전 배양하였다(200rpm, 30℃, 2days).
- [0049] 상기 전 배양한 균주를 증류수로 2번 세척 후, 같은 부피로 희석한 뒤, 본 배양액 부피의 1%(v/v)으로 하여 접종하였다. 최소 배지(최소배지 조성: 1.5g/L KH_2PO_4 , 3.6g/L Na_2HPO_4 , 0.2 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2% (w/v) Tween 80, 1ml의 미량원소 용액). 미량 원소 용액의 함량은 아래와 같은 조성으로 제조 하였다. $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.25g, CuSO_4 0.64g, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.56g, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.40g과 10ml의 35%(w/v) HCl를 혼합하고 최종 부피를 1L로 하여 혼합한다.

[0050] 질소원으로써 암모늄 설페이트, 암모늄 클로라이드, 암모늄 니트레이트, 요소 등을 사용하였다. 탄소원으로는 실시예 1에서 분리한 지방을 배양액의 총 부피에 대하여 0.5 내지 10.0 %(w/v)를 사용하여 배양하였다. 질소원의 사용량은 탄소원과 질소원이 5:1, 10:1, 20:1, 40:1, 80:1 (g/L)의 비가 되도록 사용하였다.

[0051] 그런 다음, 호기 조건, 30℃ 및 200 rpm의 조건 하에서 3일 동안 배양한 후, 원심분리를 통해 균주를 수거하였다.

[0053] 2-2. 가스 크로마토그래피(gas chromatography) 분석

[0054] 수거한 균주를 증류수 10 mL로 씻어낸 후 -80℃에서 하루를 얼린 후에 3일간 동결건조를 실시하였다. 균주를 동결건조 한 후, 10 mg을 따로 유기용매 용기에 옮기고 클로로포름 1 mL 및 15% 황산 메탄올을 첨가하였다. 그런 다음, 100℃에서 2시간 동안 FAME(Fatty acid methyl ester) 반응시킨 후, 냉온에서 샘플을 충분히 식혔다. 그런 다음, 증류수 1 mL을 첨가하고 충분히 흔들어 준 다음, 5분간 상온에 보관하였다. 그런 다음, 유리 피펫을 이용하여 하단부의 클로로포름층 0.5 mL을 에펜튜브로 옮겼다. 그런 다음, 10 mg 황산나트륨을 첨가하고 1분간 보관하여 완전히 탈수시켰다. 그런 다음, 탈수된 용액을 필터(filter)로 필터링한 후 GC(Gas chromatography) (분석 조건은 하기 표 1과 같음)를 이용하여 분석하였다.

표 1

	분석
주입기	210℃
오븐	80℃/5분, 220/5분, 승온율 20분
검출기	230℃
컬럼종류	Agilent HP-FFAP 30m x 0.32mm, i.d.0.25µm film

[0057] 2-3. P(HB-co-HHx)의 분리, 정제 및 물성 확인

[0058] 랄스토니아 균주 내의 지질 추출과 동시에 3-히드록시 뷰티레이트(3-hydroxy butyrate) 및 3-히드록시 헥사노에이트(3-hydroxy hexanoate)의 메틸 에스터 형태를 만들기 위해 메탄분해(Methanolysis) 과정으로 85% 메탄올(methanol)과 15% H₂SO₄의 1 mL과 1 mL의 클로로포름(chloroform)을 혼합하여 100℃에서 2시간 열처리하였다. 그런 다음, 얼음 냉각(ice cooling)을 하고 0.5 mL의 증류수를 넣고 1분간 볼텍싱(vortexing)하였다. 상 분리를 위해 2분 정도 방치한 후, 상등액을 제거하고 무수화시켰다. 그런 다음, 남은 샘플을 오염원 제거를 위해 여과(filtration)하였다.

[0060] 2-4. 결과 확인

[0061] 실시예 1의 방법으로 계란 폐기물에서 분리한 지방을 0.5 내지 10.0 %(w/v) 내외의 탄소원으로 하여 바이오플라스틱의 일종인 P(HB-co-HHx)을 생산한 결과, 1-10 g/L정도의 세포량과 세포 무게의 40% 내외의 P(HB-co-HHx)을 생산하는 것을 확인할 수 있었으며, 랄스토니아의 성장과 바이오 플라스틱의 생산에 있어 지방의 함량에 따라 세포 성장 및 단량체의 비율에는 큰 차이는 없으나, PHA 함량은 지방의 함량이 증가할 수록 높아짐을 알 수 있다(도 4의 A, B).

[0062] 질소원의 종류를 달리하여 세포 성장, 세포 내 플라스틱 함량 및 플라스틱 단량체인 3HB와 3HHx의 비율을 확인하여 본 결과, 질소원으로써 선택할 수 있는 물질들 중 암모늄 니트레이트를 사용하였을 때 세포 성장이 우수한 것을 확인할 수 있다(도 5의 A, B).

[0063] 탄소원 대 질소원 비율을 달리하여 세포 성장과 세포 내 플라스틱 함량 및 플라스틱 단량체인 3HB와 3HHx의 비율을 확인하여 본 결과, 탄소원과 질소원의 비(w/v)가 20:1 일 때 세포의 성장이 가장 빠르고 플라스틱의 생산 총 양이 극대화 되는 것을 확인하였으며, 계란 찌꺼기에서 분리한 오일을 탄소원으로 사용할 경우 탄소원과 질소원의 비율이 중요한 요소임을 알 수 있다(도 6의 A, B).

[0065] 결론적으로, 본 발명을 통해 계란 폐기물에서 추출한 지방 성분을 기질로 하여 랄스토니아 유트로파를 이용하여 바이오플라스틱 중 특수한 물성을 가지는 P(HB-co-HHx)를 대량생산 할 수 있음을 알 수 있다. 계란 폐기물에서 생산된 지방을 활용하여 이를 랄스토니아 유트로파에 적용함으로써 통상 추출과정에 사용된 지방에 따른 비균일한 지방 추출물을 미생물 공정을 통하여 균일하게 만들어 낼 수 있고, 추출된 소량의 지방 성분을 대량 배양의 미생물 공정을 통하여 수배에서 수십배의 생산 증대 효과를 가져올 수 있으며, 친환경적인 공정을 도입할 수 있음

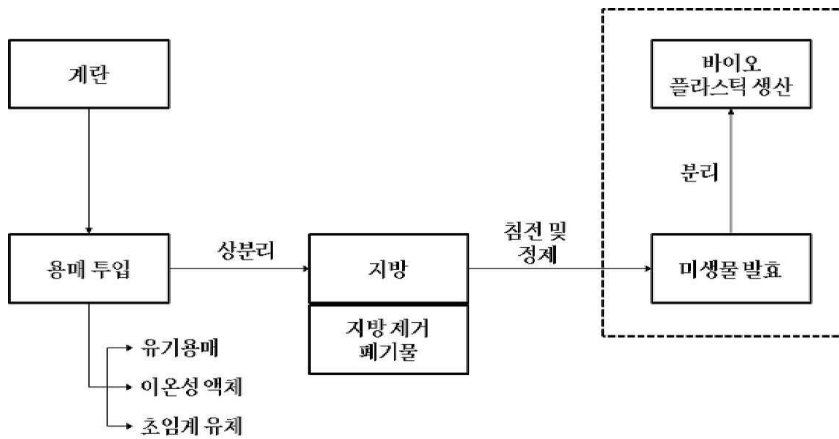
을 확인할 수 있다.

[0066] 본 발명에 사용된 용어는 통상적이거나 사전적인 의미로 한정해서 해석되어서는 아니 되며, 본 발명의 기술적 사상에 부합하는 의미와 개념으로 해석되어야 할 것이다.

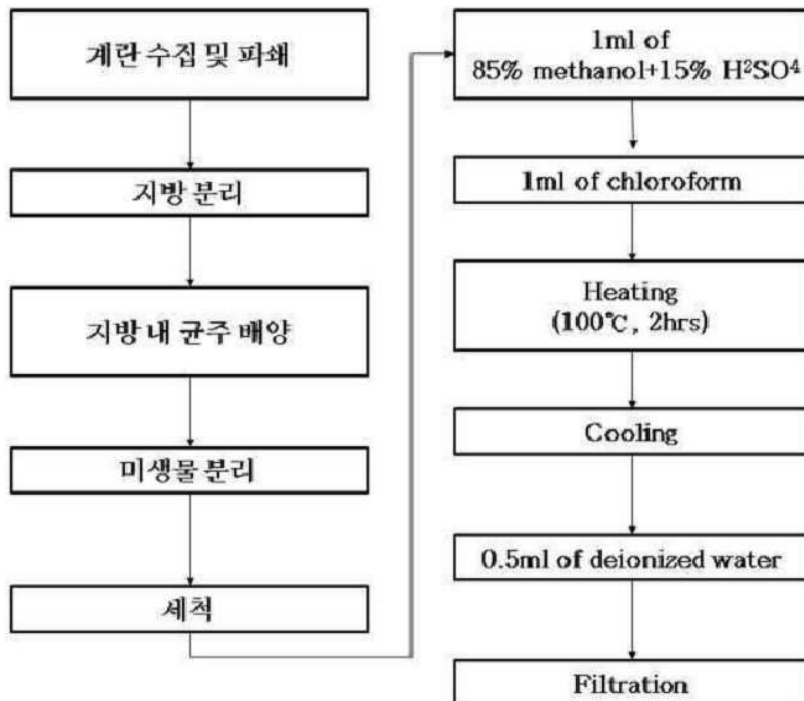
[0067] 또한, 본 명세서에 기재된 실시예 및 도면은 본 발명의 가장 바람직한 하나의 예시에 불과할 뿐, 본 발명의 기술적 사상을 모두 대변하는 것은 아니므로, 이들을 대체할 수 있는 다양한 균등물과 변형 예들이 있을 수 있음을 이해하여야 할 것이다.

도면

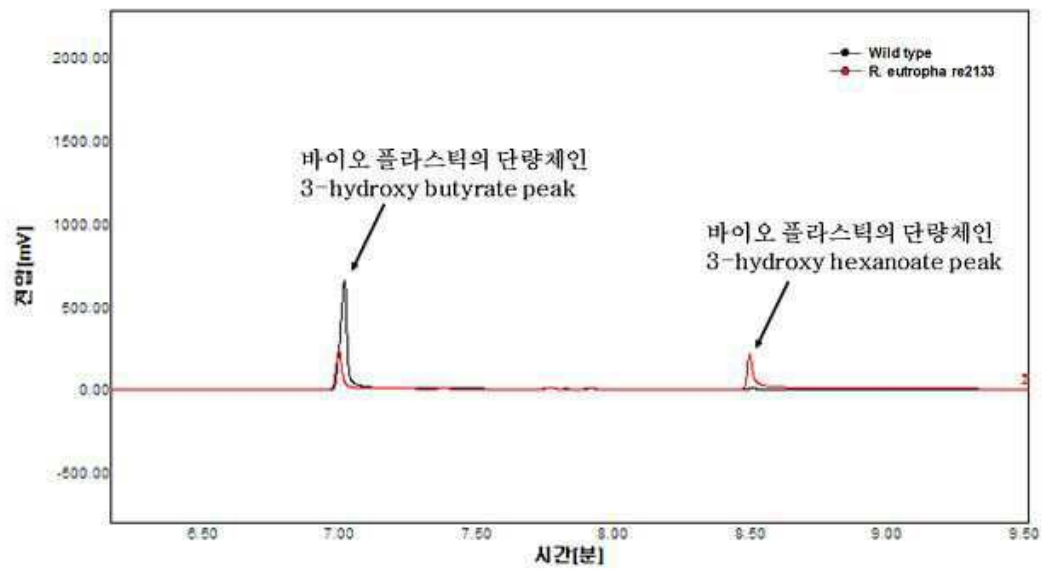
도면1



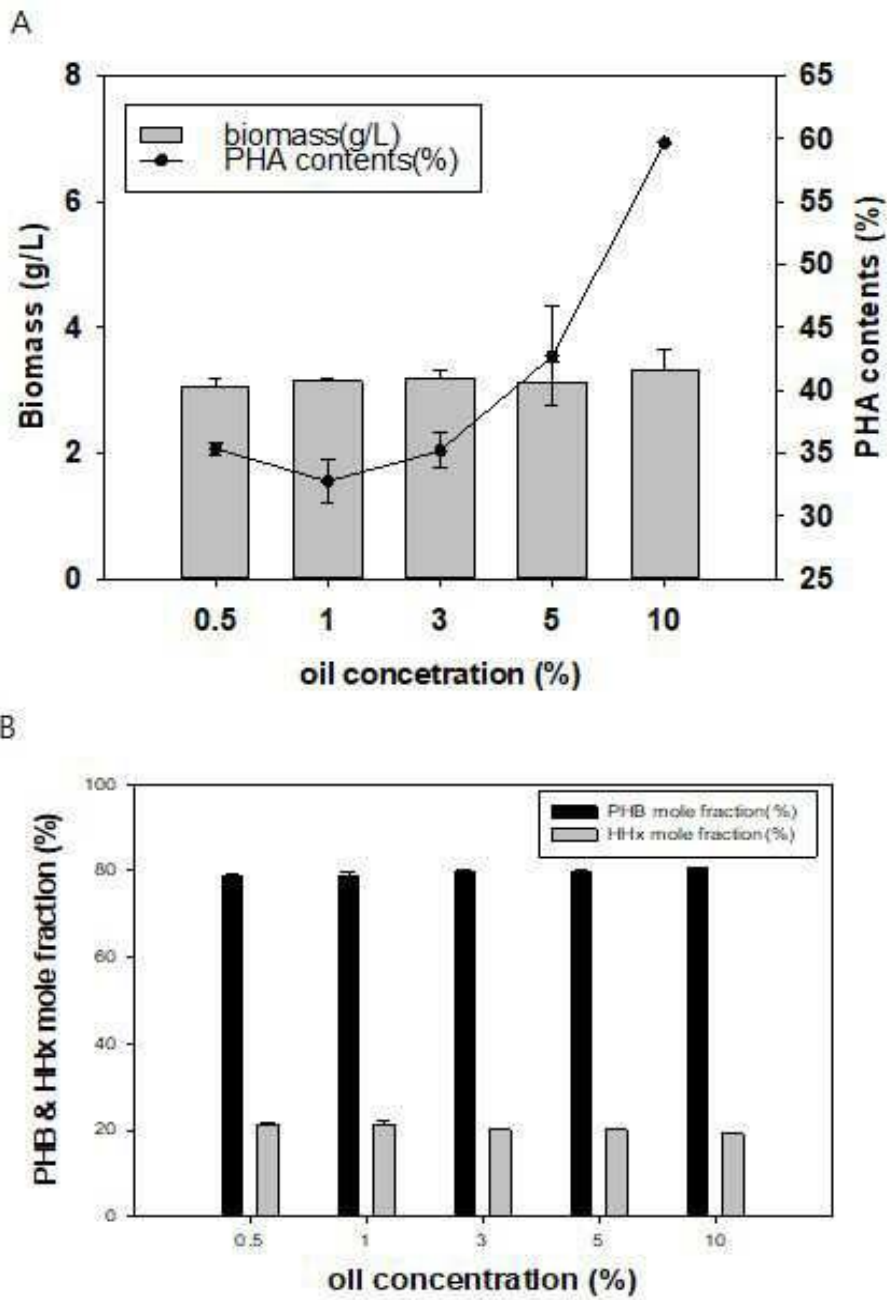
도면2



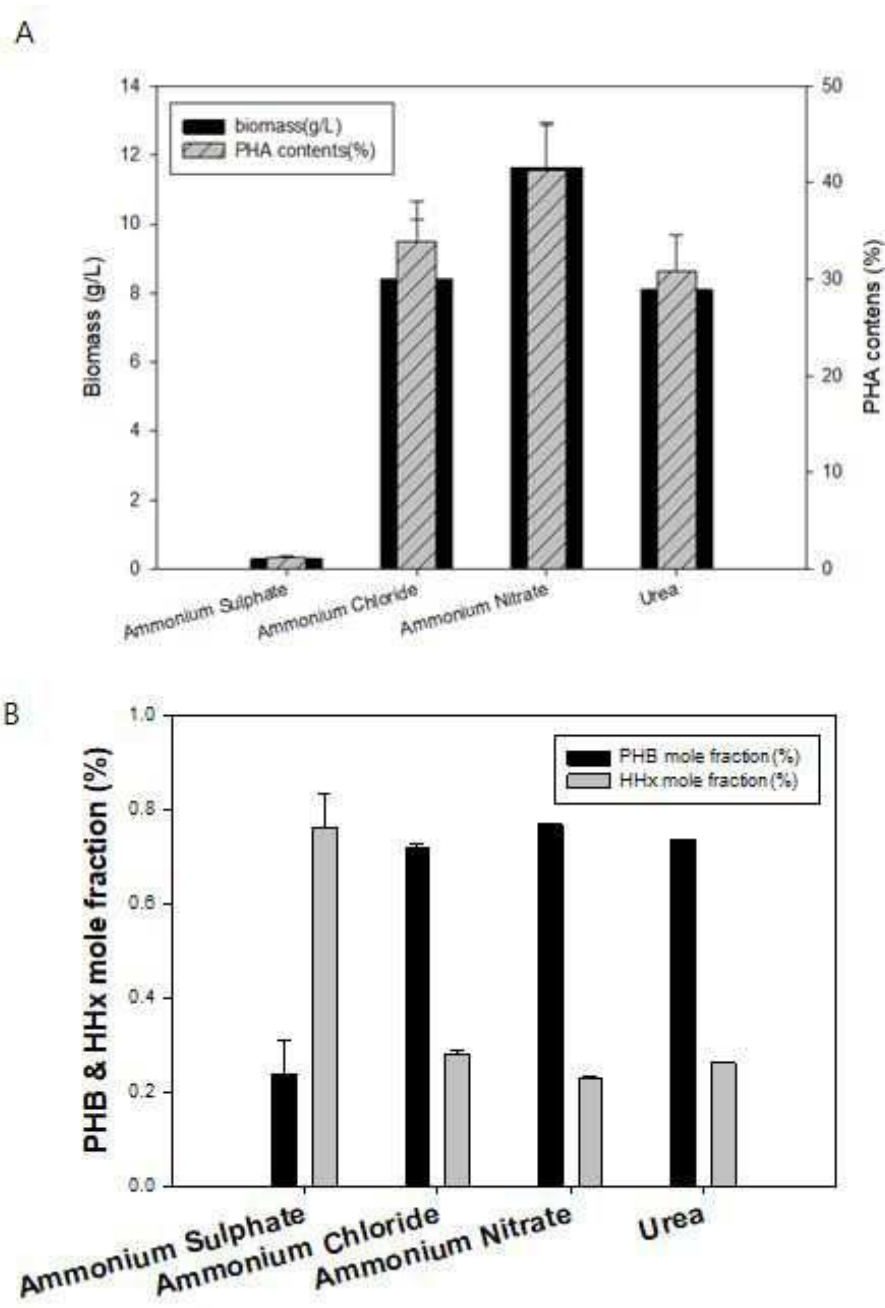
도면3



도면4

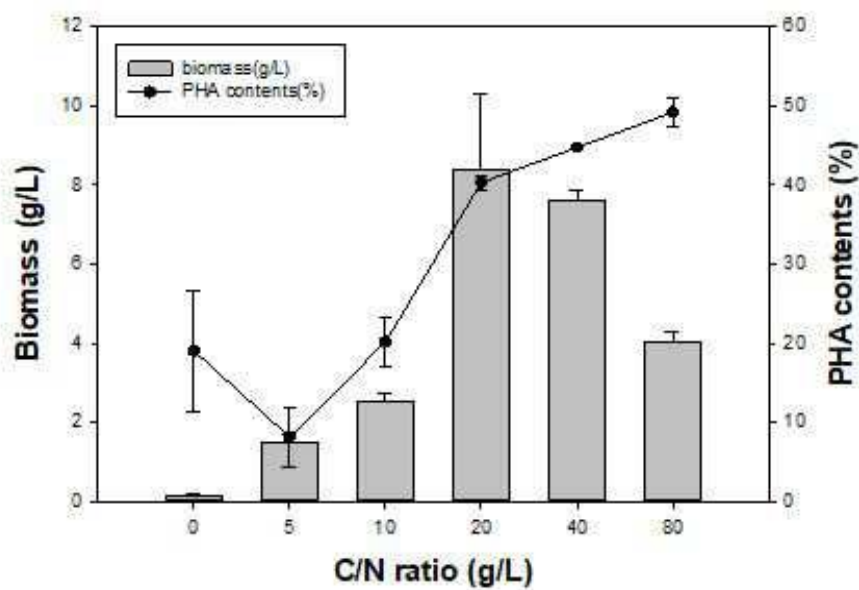


도면5



도면6

A



B

