

명세서

발명의 명칭: 과초산 분해 방법 및 이를 이용한 미생물의 배양방법

기술분야

- [1] 본 발명은 과초산을 물에 혼합하는 단계; 및 상기 혼합물에 철 이온, 알칼리금속의 수산화물, EDTA(Ethylenediaminetetraacetic acid) 및 당을 첨가하고 반응시켜 과초산 반응물을 최종적으로 초산, 물 및 산소로 분해시키는 단계를 포함하는 과초산의 분해 방법 및 상기 방법을 이용한 미생물의 배양방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 바이오산업에서 다양한 미생물을 이용하여 유용성 대사산물을 대량으로 생산하고자 할 경우, 배지와 반응기의 멸균이 상당히 중요하다. 이를 위해 종래에는 미생물 배양 배지와 반응기를 멸균하기 위해서 오토클레이브(autoclave)를 주로 이용했다.
- [3] 그러나, 오토클레이브를 이용하여 배지와 반응기를 멸균하는 경우 배지의 당성분이 배지의 다른 성분 중 하나인 단백질(펩톤 또는 효모추출물)과 고열에서 반응, 하이드록시메틸 퍼퓨랄(hydroxymethyl furfural; HMF) 등과 같은 미생물의 성장을 방해할 수 있는 독성 물질의 발생을 유발하여, 미생물의 생육을 저해하는 문제점이 있었고, 미생물 반응기의 재질이 금속이나 유리 같은 열과 압력에 강한 재질로 구성되어야 하는 한계점이 있다.
- [4] 상기와 같은 문제점 및 한계점을 극복하기 위해서, 여과(filtration)를 하는 방법이 사용되고 있지만, 여과를 하는 경우에는 배양기 자체를 따로 멸균해야 하는 불편함이 있었고, 여과 과정에서 막힘 현상과 재 오염의 위험성이 크며, 필터의 사이즈가 제한적이고 비용이 많이 소요돼서 상업적 이용 가능성이 낮다는 문제점이 있었다.
- [5] 이러한 문제점을 해결하기 위하여, 한국공개특허공보 제10-2015-0097295호에 개시된 바와 같이 과초산(peracetic acid; PAA)을 이용한 멸균 방법이 개발되었다. 한국공개특허공보 제10-2015-0097295호는 광을 필요로 하는 미세조류를 순수배양함에 있어서, 과초산을 이용하여 광생물 반응기를 멸균하는 방법을 개시하고 있다. 그러나, 상기 선행문헌에는 EDTA와 당(글루코오스, 자당, 폐당 등)에 의해서 과초산의 분해효율 증가에 대한 개시가 없고, 당과 질소원(펩톤, Yeast extract, 유청 등)을 포함하는 배지를 멸균하는 방법에 대해서는 전혀 개시되어 있지 않다.
- [6] 또한, 과초산을 이용하여 광생물 반응기와 배지를 멸균하는 방법에서 배지 성분에 당과 질소원이 포함된 경우 완전한 멸균을 위해서는 5 mM 이상의 고농도의 과초산이 사용되어야 하고, 특히 질소원이 첨가된 배지를 같이 멸균시키는 경우 과초산에 의한 질소산화물(NO_3^-)이 생성되며 생성된

질소산화물이 철이온과 결합하여 과초산 분해를 위한 촉매반응을 저해시킨다. 이러한 경우 과초산의 자연분해와 철과 HEPES에 의한 촉매반응만으로는 과초산 반응물이 완전히 분해되는데 한달 이상의 시간이 요구된다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명의 목적은 과초산과 물을 혼합하는 단계; 및
- [8] 상기 혼합물에 철 이온, 알칼리금속의 수산화물, EDTA(Ethylenediaminetetraacetic acid) 및 당을 첨가하고 반응시켜 과초산 반응물을 최종적으로 초산, 물 및 산소로 분해시키는 단계를 포함하는 과초산의 분해 방법을 제공하는 것이다.
- [9] 본 발명의 다른 목적은 당과 질소원을 포함하는 배지에 과초산을 첨가하고, 반응시켜 멸균하는 단계; 및
- [10] 상기 멸균한 배지에 과초산 분해 촉진제로서 철 이온, 알칼리금속의 수산화물, 및 EDTA를 첨가하고, 상기 배지 내에서 상기 과초산 및 과초산 분해 촉진제를 반응시켜 과초산 반응물을 최종적으로 초산, 물 및 산소로 분해시키는 단계를 포함하는 배지의 멸균방법을 제공하는 것이다.
- [11] 본 발명의 다른 목적은 생물 반응기에 상기 배지의 멸균방법에 의해 멸균된 배지를 첨가하는 단계; 및
- [12] 상기 첨가된 배지에 미생물을 접종하고, 순수배양하는 단계를 포함하는 미생물의 배양방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [13] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 과초산과 물을 혼합하는 단계; 및
- [14] 상기 혼합물에 철 이온, 알칼리금속의 수산화물, EDTA(Ethylenediaminetetraacetic acid) 및 당을 첨가하고 반응시켜 과초산 반응물을 최종적으로 초산, 물 및 산소로 분해시키는 단계를 포함하는 과초산의 분해 방법을 제공한다.
- [15] 또한, 본 발명은 당과 질소원을 포함하는 배지에 과초산을 첨가하고, 반응시켜 멸균하는 단계; 및
- [16] 상기 멸균한 배지에 과초산 분해 촉진제로서 철 이온, 알칼리금속의 수산화물, 및 EDTA를 첨가하고, 상기 배지 내에서 상기 과초산 및 과초산 분해 촉진제를 반응시켜 과초산 반응물을 최종적으로 초산, 물 및 산소로 분해시키는 단계를 포함하는 배지의 멸균방법을 제공한다.
- [17] 아울러, 본 발명은 생물 반응기에 상기 배지의 멸균방법에 의해 멸균된 배지를 첨가하는 단계; 및
- [18] 상기 첨가된 배지에 미생물을 접종하고, 순수배양하는 단계를 포함하는 미생물의 배양방법을 제공한다.

발명의 효과

- [19] 본 발명은 과초산의 분해 방법 및 상기 방법을 이용한 미생물의 배양방법에 관한 것으로서, 본 발명의 방법을 이용하여 미생물을 배양하는 경우 생물반응기와 배지를 열을 이용하지 않고 완벽하게 멸균시킬 수 있으며 멸균된 세척수의 사용 없이 화학적 멸균제로 사용된 배지에 존재하는 과초산을 분해시켜 효과적으로 제거할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [20] 도 1은 과초산 분해에 있어서 EDTA를 첨가하지 않았을 경우 철 이온의 응집 상태를 현미경으로 관찰한 것을 나타낸 것이다.
- [21] 도 2는 과초산 분해에 있어서 EDTA를 첨가했을 경우 철 이온의 응집 상태를 현미경으로 관찰한 것을 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [22] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 상세히 설명한다.
- [23] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것이며, 본 발명의 내용이 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[24]

[25] 실시예 1: 과초산의 분해 확인

- [26] 1 L의 Aurantiochytrium 배지에 10.52 mM가 되도록 과초산(동명ONC, 160126)을 첨가하고, 2시간 동안 반응시켜 멸균하였다. 상기 과초산으로 멸균한 배지에 96 μ M FeCl₃(Sigma, 7705-08-0), 5.5 mM NaOH(Sigma, 1310-73-2), 96 μ M EDTA(Sigma, 60-00-4), 및 20 g/L 글루코스(Glucose)(Sigma, 50-99-7)가 되도록 각각의 성분을 첨가하고, 1일 이상 반응시켜 과초산과 그 반응물을 최종적으로 초산, 물, 및 산소로 분해시켰고, peroxide test sticks(Quantofix Peroxide 100, Macherey-Nagel GmbH & Co., Germany)로 과초산의 분해여부를 측정하였다.

- [27] 이때, 상기 Aurantiochytrium 배지는 1 L를 기준으로, 효모 추출물(Sigma, 8013-01-2) 2 g, 펩톤(Sigma, 91079-40-2) 2 g, D-글루코스(Sigma, 50-99-7) 20 g, 해수(seawater)(Namhae Sea) 500 mL 및 증류수 500 mL로 구성되어 있다(표 5).

[28] [표5]

성분	양
효모 추출물	2 g
펩톤	2 g
D-글루코스	20 g
해수	500 mL
증류수	500 mL
총량	1 L

[29]

[30] **비교예 1**

[31] 실시예 1과 동일한 방법으로 실험을 수행하되, EDTA를 첨가하지 않았다.

[32]

[33] **비교예 2**

[34] 실시예 1과 동일한 방법으로 실험을 수행하되, 글루코스를 첨가하지 않았다.

[35]

[36] **실시예 2 내지 6: 글루코스 농도의 차이**

[37] 실시예 1과 동일한 방법으로 실험을 수행하되, 첨가하는 글루코스의 양을 각각 10 g/L(실시예 2), 30 g/L(실시예 3), 40 g/L 또는 (실시예 4), 50 g/L(실시예 5), 또는 60 g/L(실시예 6)를 첨가하였다.

[38]

[39] **실시예 7 내지 12: 수크로스 농도의 차이**

[40] 실시예 1과 동일한 방법으로 실험을 수행하되, 글루코스 대신에 수크로스의 양을 각각 10 g/L(실시예 7), 20 g/L(실시예 8), 30 g/L(실시예 9), 40 g/L(실시예 10), 50 g/L(실시예 11), 또는 60 g/L(실시예 12)를 첨가하였다.

[41]

[42] **비교예 3 내지 9**

[43] 실시예 1과 동일한 방법으로 실험을 수행하되, EDTA를 첨가하지 않고 FeCl_3 대신 CaCl_2 를 첨가(비교예 3), EDTA를 첨가하고 FeCl_3 대신 CaCl_2 를 첨가(비교예 4), EDTA를 첨가하지 않고 FeCl_3 대신 FeSO_4 를 첨가(비교예 5), EDTA를 첨가하지 않고 FeCl_3 대신 MgCl_2 를 첨가(비교예 6), EDTA를 첨가하고 FeCl_3 대신 MgCl_2 를 첨가(비교예 7), EDTA를 첨가하지 않고 FeCl_3 대신 ZnCl_2 를 첨가(비교예 8), EDTA를 첨가하고 FeCl_3 대신 ZnCl_2 를 첨가(비교예 9)하였다.

[44]

[45] **실시예 13**

[46] 실시예 1과 동일한 방법으로 실험을 수행하되, FeCl_3 대신 FeSO_4 를 첨가하였다.

[47]

[48] **실험예 1: EDTA의 효과**

[49] 과초산 분해에 있어서 EDTA의 효과를 확인하기 위해서, 실시예 1 및 비교예 1와 같은 방법으로 실험을 수행하였다.

[50] 그 결과, EDTA를 첨가하지 않았을 경우(비교예 1, 도 1)에는 EDTA를 넣었을 경우(실시예 1, 도 2)에 비해서 금속이온인 철 이온의 용해도가 급격히 떨어져서 과초산의 분해속도가 현저히 감소함을 확인할 수 있었다(표 1).

[51] 또한, EDTA를 넣었을 경우(실시예 1, 도 2)에 비해서 EDTA를 첨가하지 않았을 경우(비교예 1)에는 철 이온이 다른 고분자 안에서 응축되어 결합되어 있음을 확인할 수 있었다(도 1). 이 결과는 EDTA가 존재할 경우 철 이온이 수용성 상태로 존재하여 과초산 분해의 반응성이 높아지지만, EDTA가 존재하지 않는

경우 철 이온이 수용성 상태로 존재하지 않거나 다른 성분과 결합하여 과초산 분해의 반응성이 낮아짐을 제시한다.

[52] [표1]

Time (hour)	실시예 1	비교예 1
hour	PAA + N + G(20)FeCl ₃ +EDTA	PAA + N + G(20)FeCl ₃
0	>200	>200
6	100	>200
12	0	>200
18	0	>200
24	0	>200
30	0	>200

[53] N : NaOH, G : 글루코스, F : FeCl₃, F(E) : FeCl₃ + EDTA

[54] 상기 표안의 숫자는 존재하는 과초산의 농도를 의미하고, 예를 들어 >200는 200 mg/L 이상의 과초산이 남아 있음을 의미함

[55]

[56] **실험예 2: 글루코스의 효과**

[57] 과초산 분해에 있어서 글루코스의 효과를 확인하기 위해서, 실시예 1 내지 6 및 비교예 2와 같은 방법으로 실험을 수행하였다.

[58] 그 결과, 글루코스를 넣지 않았을 경우 과초산이 거의 분해되지 않았지만, 첨가하는 글루코스의 양이 증가할수록 과초산의 분해속도가 점점 빨라짐을 확인할 수 있었다(표 2).

[59] [표2]

Time (hour)	비교예 2	실시예 2	실시예 1	실시예 3	실시예 4	실시예 5	실시예 6
hour	PAAF(E)+N	PAAF(E)+N+G(10)	PAAF(E)+N+G(20)	PAAF(E)+N+G(30)	PAAF(E)+N+G(40)	PAAF(E)+N+G(50)	PAAF(E)+N+G(60)
0	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
6	>200	>200	100	60	20	14	10
12	>200	0	0	0	0	0	0
24	>200	0	0	0	0	0	0

[60] N : NaOH, G : 글루코스, F : FeCl₃, F(E) : FeCl₃ + EDTA

[61] 상기 표안의 숫자는 존재하는 과초산의 농도를 의미하고, 예를 들어 >200는

200 mg/L 이상의 과초산이 남아 있음을 의미함

[62]

[63] 실험예 3: 수크로스의 효과

[64] 과초산 분해에 있어서 수크로스의 효과를 확인하기 위해서, 실시예 7 내지 12 및 비교예 2와 같은 방법으로 실험을 수행하였다.

[65] 그 결과, 당을 넣지 않은 경우 과초산이 거의 분해되지 않았지만, 첨가하는 수크로스의 양이 증가할수록 과초산의 분해속도가 점점 빨라짐을 확인할 수 있었다(표 3).

[66] [표3]

Time (hour)	비교예 2	실시예 7	실시예 8	실시예 9	실시예 10	실시예 11	실시예 12
hour	PAAF(E)+N	PAAF(E)+N+S(10)	PAAF(E)+N+S(20)	PAAF(E)+N+S(30)	PAAF(E)+N+S(40)	PAAF(E)+N+S(50)	PAAF(E)+N+S(60)
0	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
6	>200	>200	>200	>200	>200	160	140
12	>200	0	0	0	0	0	0
24	>200	0	0	0	0	0	0

[67] N : NaOH, G : 글루코스, S : 수크로스, F : FeCl₃, F(E) : FeCl₃ + EDTA

[68] 상기 표안의 숫자는 존재하는 과초산의 농도를 의미하고, 예를 들어 >200는 200 mg/L 이상의 과초산이 남아 있음을 의미함

[69]

[70] 실험예 4: 금속의 효과

[71] 초산 분해에 있어서 금속의 효과를 확인하기 위해서, 실시예 1, 13 및 비교예 1, 3 내지 9와 같은 방법으로 실험을 수행하였다.

[72] 그 결과, FeCl₃+EDTA 또는 FeSO₄+EDTA를 첨가했을 경우에는 과초산이 잘 분해되었지만, CaCl₂+EDTA, MgCl₂+EDTA 또는 ZnCl₂+EDTA를 첨가했을 경우에는 과초산이 거의 분해되지 않았고, FeCl₃, FeSO₄, CaCl₂, MgCl₂, 또는 ZnCl₂ 금속만을 첨가하고 EDTA를 첨가하지 않은 경우에는 과초산이 거의 분해되지 않음을 확인할 수 있었다(표 4).

[73] [표4]

Time (hour)	비교예 2	실시예 7	실시예 8	실시예 9	실시예 10	실시예 11	실시예 12
hour	PAAF(E)+N	PAAF(E)+N+S(10)	PAAF(E)+N+S(20)	PAAF(E)+N+S(30)	PAAF(E)+N+S(40)	PAAF(E)+N+S(50)	PAAF(E)+N+S(60)
0	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200
6	>200	>200	>200	>200	>200	160	140
12	>200	0	0	0	0	0	0
24	>200	0	0	0	0	0	0

[74]

[75] N : NaOH, G : 글루코스, S : 수크로스

[76] 상기 표안의 숫자는 존재하는 과초산의 농도를 의미하고, 예를 들어 >200는 200 mg/L 이상의 과초산이 남아 있음을 의미함

발명의 실시를 위한 형태

[77] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[78]

[79] 본 발명은 과초산과 물을 혼합하는 단계; 및

[80] 상기 혼합물에 철 이온, 알칼리금속의 수산화물,

EDTA(Ethylenediaminetetraacetic acid) 및 당을 첨가하고 반응시켜 과초산 반응물을 최종적으로 초산, 물 및 산소로 분해시키는 단계를 포함하는 과초산의 분해 방법을 제공한다.

[81] 본 발명에서 사용된 용어 "멸균(sterilization)"이라 함은 미생물의 영양세포 및 포자를 사멸시키는 것을 의미한다.

[82] 본 발명의 상기 과초산의 분해 방법에서, 상기 철 이온은 Fe^{2+} 이온 또는 Fe^{3+} 이온일 수 있고, 상기 철 이온은 $FeCl_3$, $FeCl_2$, $FeSO_4$ 등의 Fe을 함유한 염으로부터 유래될 수 있다.

[83] 본 발명의 상기 과초산의 분해 방법에서, 알칼리금속의 수산화물은 LiOH, NaOH 또는 KOH일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[84] 본 발명의 상기 과초산의 분해 방법에서, 상기 알칼리금속의 수산화물, 예컨대 NaOH를 사용하여 과초산(PAA)의 분해에 적합한 pH 값을 쉽게 구현할 수 있고, 이로 인해 과초산의 분해가 빨리 일어날 수 있다.

[85] 본 발명의 상기 과초산의 분해 방법에서, EDTA(Ethylenediaminetetraacetic acid)는 철 이온의 용해도를 증가시키고 철과 다른 물질과의 결합을 막아

과초산의 분해를 촉진하는 것일 수 있다.

- [86] 본 발명의 상기 과초산의 분해 방법에서, 첨가하는 철 이온의 몰 농도가 EDTA의 몰 농도보다 조금 더 많거나 적은 경우보다 첨가하는 철 이온과 EDTA의 몰 농도가 유사할수록 과초산의 분해 속도가 더 빠를 수 있고, 첨가하는 철 이온과 EDTA의 몰 농도가 동일할 경우 과초산의 분해 속도가 가장 빠를 수 있다. 예를 들어, 철 이온과 EDTA의 몰 농도비가 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 또는 1:1일 수 있고, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10일 수 있다. 반응시 존재하는 EDTA의 양이 철이온의 양보다 많을 경우 철이온에 의한 펜톤 반응을 방해하여 철에 의한 과초산의 분해 기작을 방해할 수 있다.
- [87] 본 발명의 상기 과초산의 분해 방법에서, 상기 당은 미생물의 탄소원으로서는 글루코스, 수크로스, 또는 폐당(당밀) 등 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [88] 또한, 상기 당의 농도는 100 g/L 이하, 바람직하게는 5 내지 50 g/L일 수 있다.
- [89] 본 발명의 상기 과초산의 분해 방법에서, 알칼리금속의 수산화물 대신에 염기성 완충액을 사용 할 수 있거나 염기성 완충액을 추가로 첨가할 수 있고, 상기 염기성 완충액은 4-(2-하이드록시에틸)-1-피페라진에탄술폰산(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid; HEPES)일 수 있다.
- [90] 본 발명의 상기 과초산의 분해 방법에서, 상기 과초산은 물과 반응하여 다음과 같이 반응하여 초산과 과산화수소를 형성한다.
- [91] i) $\text{CH}_3\text{CO}_3\text{H} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$
- [92] 한편, 과초산과 물이 반응하여 생성된 과산화수소는 철 이온에 의하여 펜톤 반응(Fenton reaction)하여 최종적으로 하기의 반응식과 같이 초산, 물 및 산소로 분해된다.
- [93] ii) $2\text{CH}_3\text{CO}_3\text{H} \rightarrow 2\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H} + \text{O}_2$
- [94] iii) $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$
- [95]
- [96] 본 발명은 당과 질소원을 포함하는 배지에 과초산을 첨가하고, 반응시켜 멸균하는 단계; 및
- [97] 상기 과초산으로 멸균한 배지에 과초산 분해 촉진제로서 철 이온, 알칼리금속의 수산화물, 및 EDTA를 첨가하고, 상기 배지 내에서 상기 과초산 및 과초산 분해 촉진제를 반응시켜 과초산 반응물을 최종적으로 초산, 물 및 산소로 분해시키는 단계를 포함하는 배지의 멸균방법을 제공한다.
- [98] 본 발명의 상기 배지의 멸균방법에서, 멸균한 배지에 존재하는 과초산 및 과초산 반응물을 최종적으로 초산, 물 및 산소로 분해시켜 멸균에 사용된 배지에 존재하는 과초산과 과초산 반응물을 제거할 수 있고, 이를 통해 제조된 배지를 미생물 배양에 이용할 수 있다.
- [99] 본 발명의 상기 배지의 멸균방법에서, 상기 배지는 효모나

오란티오키토리움(*Aurantiochytrium*) 등을 배양할 경우와 같이, 당(글루코오스, 자당, 폐당 등)과 질소원 (펩톤, Yeast extract, 유청 등)을 필요로 하는 배지 일 수 있다.

- [100] 본 발명의 상기 배지의 멸균방법에서, 상기 배지는 해수중, 담수중 등과 같은 미세조류를 배양할 경우와 같이, 광(light)을 필요로 하는 배지일 수 있다.
- [101] 본 발명의 상기 배지의 멸균방법에서, 상기 철 이온은 Fe^{2+} 이온 또는 Fe^{3+} 이온일 수 있고, 상기 철 이온은 FeCl_3 , FeCl_2 , FeSO_4 등의 Fe를 함유한 염으로부터 유래될 수 있다.
- [102] 본 발명의 상기 배지의 멸균방법에서, 알칼리금속의 수산화물은 LiOH, NaOH 또는 KOH일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [103] 본 발명의 상기 과초산의 분해 방법에서, 상기 알칼리금속의 수산화물, 예컨대 NaOH를 사용하여 과초산(PAA)의 분해에 적합한 pH 값을 쉽게 구현할 수 있고, 이로 인해 과초산의 분해가 빨리 일어날 수 있다.
- [104] 본 발명의 상기 배지의 멸균방법에서, EDTA(Ethylenediaminetetraacetic acid)는 철 이온의 용해도를 증가시키고 다른 구성성분과의 결합을 막아 과초산의 분해를 촉진할 수 있다.
- [105] 본 발명의 상기 배지의 멸균방법에서, 첨가하는 철 이온의 몰 농도가 EDTA의 몰 농도보다 조금 더 많거나 적은 경우보다 첨가하는 철 이온과 EDTA의 몰 농도가 유사할수록 과초산의 분해 속도가 더 빠를 수 있고, 첨가하는 철 이온과 EDTA의 몰농도가 동일할 경우 과초산의 분해 속도가 가장 빠를 수 있다.
- [106] 본 발명의 상기 배지의 멸균방법에서, 상기 당은 글루코스, 수크로스, 또는 폐당(당밀)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [107] 또한, 상기 당의 농도는 100 g/L 이하, 바람직하게는 5 내지 50 g/L일 수 있다.
- [108] 본 발명의 상기 배지의 멸균방법에서, 알칼리금속의 수산화물 대신에 염기성 완충액을 사용 할 수 있거나 염기성 완충액을 추가로 첨가할 수 있고, 상기 염기성 완충액은 4-(2-하이드록시에틸)-1-피페라진에탄술폰산(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid; HEPES)일 수 있다.
- [109] 본 발명의 상기 방법과 같이 배지를 멸균하면, 중화하기 전까지 오토클레이브하지 않고도, 또한 개방된 용기에서도 오염되지 않고 오랫동안 보관할 수 있다는 장점이 있다.
- [110] 본 발명은 멸균된 생물 반응기 또는 생물 반응기에 상기 배지의 멸균방법에 의해 멸균된 배지를 첨가하는 단계; 및
- [111] 상기 첨가된 배지에 미생물을 접종하고, 순수배양하는 단계를 포함하는 미생물의 배양방법을 제공한다.
- [112] 본 발명의 상기 미생물의 배양방법에서, 상기 미생물의 예로는 오란티오키토리움 속(*Aurantiochytrium* sp.), 시조키티리움 속(*Schizochytrium* sp.) 클로렐라 속(*Chlorella* sp.), 시네코시스티스 속(*Synechocystis* sp.),

테바리오미세스 속 (Debaryomyces sp.), 효모균군(Yeasts), 유산균군(Lactic acid bacteria), 방선균군(Actinomycetes), 유글레나(Euglena), 모티리엘라(Mortierella) 사상균군 및 광합성 세균으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [113] 또한, 본 발명은 생물 반응기에 당과 질소원을 포함하는 배지를 넣고 과초산을 첨가하고, 반응시켜 생물 반응기와 배지를 동시에 멸균하는 방법을 제공한다.
- [114]
- [115] 본 발명의 일 실시예에 따르면, Aurantiochytrium 배지에 과초산을 첨가하고, 2시간 동안 반응시켜 멸균한 배지에 FeCl_3 , NaOH, EDTA, 및 글루코스(Glucose)를 첨가하고, 1일 이상 반응시킨 경우 과초산이 최종적으로 초산, 물, 및 산소로 현저히 빠른 속도로 분해됨을 확인하였다(실험예 1).
- [116] 다만, 본 발명 일 실시예에 따르면, Aurantiochytrium 배지에 과초산을 첨가하고, 2시간 동안 반응시켜 멸균한 배지에 EDTA를 제외하고 FeCl_3 , NaOH, 및 글루코스(Glucose)를 첨가하고, 1일 이상 반응시킨 경우 과초산의 분해속도가 현저히 감소함을 확인하였다(실험예 1).
- [117] 본 발명의 일 실시예에 따르면, Aurantiochytrium 배지에 과초산을 첨가하고, 2시간 동안 반응시켜 멸균한 배지에 FeCl_3 , NaOH, 및 EDTA를 첨가하고 글루코스(Glucose)의 양을 점점 증가시켜 첨가하고, 1일 이상 반응시킨 경우 첨가하는 글루코스의 양이 점점 증가할수록 과초산이 최종적으로 초산, 물, 및 산소로 분해되는 속도가 점점 증가함을 확인할 수 있었다(실험예 2).
- [118] 다만, 본 발명의 일 실시예에 따르면, Aurantiochytrium 배지에 과초산을 첨가하고, 2시간 동안 반응시켜 멸균한 배지에 글루코스(Glucose)를 제외하고 FeCl_3 , NaOH, 및 EDTA를 첨가하고, 1일 이상 반응시킨 경우 과초산의 분해속도가 현저히 감소함을 확인하였다(실험예 2). 글루코스 같은 환원성 당이 들어갈 경우 과초산에 의해서 산화된 철을 다시 환원시킴으로서 철에 의한 펜톤 반응을 활성화 시켜 철에 의한 과초산 분해에 도움을 줄 수 있다.
- [119] 본 발명의 일 실시예에 따르면, Aurantiochytrium 배지에 과초산을 첨가하고, 2시간 동안 반응시켜 멸균한 배지에 FeCl_3 , NaOH, 및 EDTA를 첨가하고 글루코스 대신 수크로스(Sucrose)의 양을 점점 증가시켜 첨가하고, 1일 이상 반응시킨 경우 첨가하는 수크로스의 양이 점점 증가할수록 과초산이 최종적으로 초산, 물, 및 산소로 분해되는 속도가 점점 증가함을 확인하였다(실험예 3).
- [120] 본 발명의 일 실시예에 따르면, Aurantiochytrium 배지에 과초산을 첨가하고, 2시간 동안 반응시켜 멸균한 배지에 금속, NaOH, 글루코스 및 EDTA를 첨가하고, 1일 이상 반응시킨 경우 FeCl_3 +EDTA 또는 FeSO_4 +EDTA를 첨가했을 경우에는 과초산이 잘 분해되었지만, CaCl_2 +EDTA, MgCl_2 +EDTA 또는 ZnCl_2 +EDTA를 첨가했을 경우에는 과초산이 거의 분해되지 않았고, FeCl_3 , FeSO_4 , CaCl_2 , MgCl_2 , 및 ZnCl_2 금속만을 첨가하고 EDTA를 첨가하지 않은 경우에는

과초산이 거의 분해되지 않음을 확인하였다(실험예 4).

산업상 이용가능성

[121] 본 발명의 과초산의 분해 방법 및 상기 방법을 이용한 미생물의 배양방법을 이용하여 미생물을 배양하는 경우 생물반응기와 배지를 열을 이용하지 않고 완벽하게 멸균시킬 수 있어서 산업적으로 유용하다.

[122]