



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0006609

(43) 공개일자 2015년01월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 1/12 (2006.01) C12N 1/02 (2006.01)

C12P 7/64 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0080194

(22) 출원일자 2013년07월09일

심사청구일자 2013년07월09일

(71) 출원인

인하대학교 산학협력단

인천광역시 남구 인하로 100, 인하대학교 (용현동)

(72) 발명자

이철균

서울 서초구 신반포로 270, 104동 801호 (반포동, 반포자이)

성동호

서울 영등포구 양평로30길 51, 102동 1605호 (양평동6가, 한솔아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

한윤호, 양기혁, 이인행, 김남식

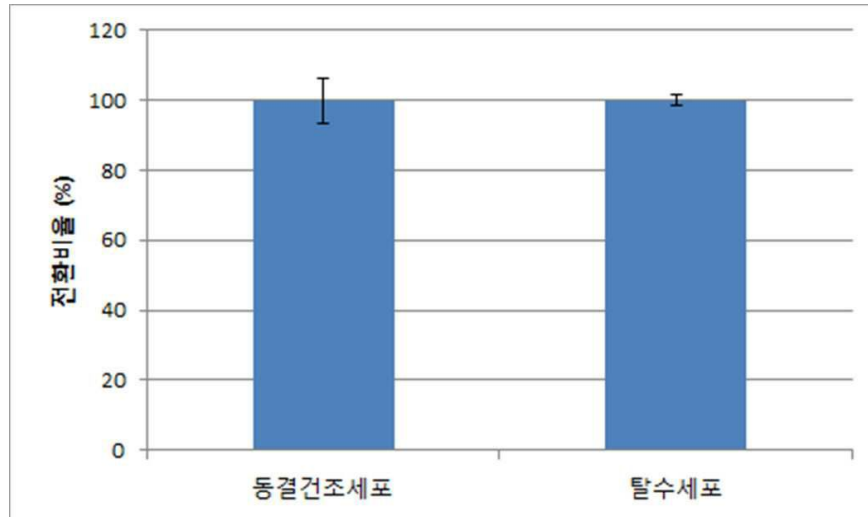
전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 발명의 명칭 미세조류의 탈수방법

(57) 요약

본 발명은 효과적으로 젖은 미세조류 균체로부터 바이오디젤을 생산하기 위하여, 미세조류를 1차원심분리하여 젖은 미세조류 균체를 수득하는 젖은 미세조류 균체 수득 단계; 상기 젖은 미세조류 균체에 탄소수 1 내지 3의 저급알코올을 가하고 교반하는 알코올 처리 단계; 및 알코올 처리된 미세조류를 2차원심분리한 후 상등액을 제거하여 탈수된 미세조류를 회수하는 탈수 미세조류 수득단계를 포함하는 미세조류의 탈수방법을 제공한다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

임상민

인천 부평구 부흥로 246, 21동 1103호 (부평동, 동아2단지아파트)

류영진

인천 남구 인하로120번길 19-1, 2층 (용현동)

이슬기

경기 시흥시 뱀내장터로25번길 20, 2층 (대야동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 46564-1

부처명 해양수산부

연구관리전문기관 한국해양과학기술진흥원

연구사업명 해양바이오에너지생산기술개발사업

연구과제명 미세조류유래 바이오디젤 생산기술개발

기 여 율 97/100

주관기관 인하대학교 산학협력단

연구기간 2012.09.01 ~ 2013.07.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 47402-1

부처명 해양수산부

연구관리전문기관 한국해양과학기술진흥원

연구사업명 해양에너지 특성화 대학원 지원사업

연구과제명 해양에너지 전문인력양성

기 여 율 3/100

주관기관 인하대학교 산학협력단

연구기간 2013.03.01 ~ 2014.02.28

특허청구의 범위

청구항 1

미세조류를 1차원심분리하여 젖은 미세조류 군체를 수득하는 젖은 미세조류 군체 수득 단계;

상기 젖은 미세조류 군체에 탄소수 1 내지 3의 저급알코올을 가하고 교반하는 알코올 처리 단계; 및

알코올 처리된 미세조류를 2차원심분리한 후 상등액을 제거하여 탈수된 미세조류를 회수하는 탈수 미세조류 수득단계를 포함하는 미세조류의 탈수방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 미세조류는 두날리엘라(*Dunalliella*), 클라미도모나스(*Chlamydomonas*), 쉼네데무스(*Scenedesmus*), 클로렐라(*Chlorella*), 유글레나(*Euglena*), 테트라셀미스(*Tetraselmis*), 보트리오크커스(*Botryococcus*), 난노클로롭시스(*Nannochloropsis*), 코코믹사(*Coccomyxa*), 페오닥티룸(*Phaeodactylum*), 시조키티리움(*Schizochytrium*) 및 아르스토피라(*Arthrospira*)로 구성된 군으로부터 선택되는 속 중 하나 이상인, 미세조류의 탈수방법.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 두날리엘라는 두날리엘라 아시도필리아(*D. acidophila*), 두날리엘라 바르다윌(*D. bardawil*), 두날리엘라 바이오쿠라타(*D. bioculata*), 두날리엘라 라테랄리스(*D. lateralis*), 두날리엘라 마리티마(*D. maritima*), 두날리엘라 미누타(*D. minuta*), 두날리엘라 파바(*D. parva*), 두날리엘라 페어세이(*D. peircei*), 두날리엘라 폴리모파(*D. polymorpha*), 두날리엘라 프리모렉타(*D. primolecta*), 두날리엘라 슈도살리나(*D. pseudosalina*), 두날리엘라 쿼토렉타(*D. quatolecta*), 두날리엘라 살리나 테오도르(*D. salina Teodor.*), 두날리엘라 테티오렉타(*D. tertiolecta*), 두날리엘라 살리나(*D. salina*) 또는 두날리엘라 비리디스(*D. viridis*)인, 미세조류의 탈수방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 1차원심분리는 2,000 내지 9,000 rpm의 속도로 수행되는, 미세조류의 탈수방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 저급알코올은 메탄올 또는 에탄올인, 미세조류의 탈수방법

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 저급 알코올은 젖은 미세조류 군체의 0.2 내지 5배 부피로 처리되는 미세조류의 탈수방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 2차원심분리는 5,000 내지 18,000 rpm의 속도로 수행되는, 미세조류의탈수방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 탈수 미세조류의 수득단계 이후에 상기 탈수 미세조류를 건조하는 건조단계가 추가적으로 포함되는, 미세조류의 탈수방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 건조단계는 자연건조, 온풍건조, 열풍건조 또는 동결건조에 의해 수행되는, 미세조류의 탈수방법.

청구항 10

미세조류를 1차원심분리하여 젖은 미세조류 군체를 수득하는 젖은 미세조류 군체 수득 단계;

상기 젖은 미세조류 군체에 탄소수 1 내지 3의 저급알코올을 가하고 교반하는 알코올 처리 단계;

알코올 처리된 미세조류를 2차원심분리한 후 상등액을 제거하여 탈수된 미세조류를 회수하는 탈수 미세조류 수득단계; 및

상기 탈수 미세조류군주에 촉매를 가하여 상기 군주 내에 존재하는 지방산 글리세롤을 지방산 에스터로 전환시키는 지방산 에스터 전환단계를 포함하는 바이오디젤의 생산방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 미세조류는 두날리엘라(*Dunalliella*), 클라미도모나스(*Chlamydomonas*), 쉼네데무스(*Scenedesmus*), 클로렐라(*Chlorella*), 유글레나(*Euglena*), 테트라셀미스(*Tetraselmis*), 보트리오코커스(*Botryococcus*), 난노클로롭시스(*Nannochloropsis*), 코코믹사(*Coccomyxa*), 페오닥틸룸(*Phaeodactylum*), 시조키티트리움(*Schizochytrium*) 및 아르스로피라(*Arthrospira*)로 구성된 군으로부터 선택되는 속 중 하나 이상인, 바이오디젤의 생산방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 두날리엘라는 두날리엘라 아시도필리아(*D. acidophila*), 두날리엘라 바르다윌(*D. bardawil*), 두날리엘라 바이오쿠라타(*D. bioculata*), 두날리엘라 라테랄리스(*D. lateralis*), 두날리엘라 마리티마(*D. maritima*), 두날리엘라 미누타(*D. minuta*), 두날리엘라 파바(*D. parva*), 두날리엘라 페어세이(*D. peircei*), 두날리엘라 폴리모파(*D. polymorpha*), 두날리엘라 프리모렉타(*D. primolecta*), 두날리엘라 슈도살리나(*D. pseudosalina*), 두날리엘라 쿼토렉타(*D. quatolecta*), 두날리엘라 살리나 테오도르(*D. salina Teodor.*), 두날리엘라 테티오렉타(*D. tertiolecta*), 두날리엘라 살리나(*D. salina*) 또는 두날리엘라 비리디스(*D. viridis*)인, 바이오디젤의 생산방법.

청구항 13

제10항에 있어서,

상기 1차원심분리는 2,000 내지 9,000 rpm의 속도로 수행되는, 바이오디젤의 생산방법.

청구항 14

제10항에 있어서,

상기 저급알코올은 메탄올 또는 에탄올인, 바이오디젤의 생산방법.

청구항 15

제10항에 있어서,

상기 저급 알코올은 젖은 미세조류 군체의 0.2 내지 5배 부피로 처리되는, 바이오디젤의 생산방법.

청구항 16

제10항에 있어서,

상기 2차원심분리는 5,000 내지 18,000 rpm의 속도로 수행되는, 바이오디젤의 생산방법.

청구항 17

제10항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 탈수 미세조류의 수득단계 이후에 상기 탈수 미세조류를 건조하는 건조단계가 추가적으로 포함되는, 바이오디젤의 생산방법.

청구항 18

제17항에 있어서,

상기 건조단계는 자연건조, 온풍건조, 열풍건조 또는 동결건조에 의해 수행되는, 바이오디젤의 생산방법.

청구항 19

제10항에 있어서,

상기 촉매는 황산/에탄올 용액 또는 산이 처리된 바이오숯(biochar)인, 바이오디젤의 생산방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 미세조류의 탈수방법에 관한 것으로서, 더 상세하게는 두날리엘라 속 미세조류 균체의 탈수방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 미세조류는 식물과 달리 뿌리, 줄기와 잎이 구별되지 않으면서 광합성을 하는 생물로서, 육안으로 개체가 식별되는 거대조류와 구별되는 현미경상에서 관찰이 가능한 생물로서 지구 전체에 다양하게 2만2천종 이상이 존재하며 아직 밝혀지지 않은 종이 더 많은 것으로 알려져 있지만 지구 생태계 먹이사슬에서 최하위에 위치하여 지구상 생물의 주요 근원적인 먹이이며 광합성을 통해 지구상에 공급되는 산소 양의 약 반 정도를 생산하고 있는 생물군이다.

[0003] 미세조류는 인류 생활과도 직접적으로 밀접한 관계를 가지고 있어서 약 2천년 전에도 중국에서 기근 시 식량으로 사용되었다는 기록과 중남미 아즈텍 문명에서도 식량으로 사용했다는 기록이 있으며 현대에 들어서는 그 완벽한 영양성분으로 인하여 양어장에서 치어의 먹이, 가축의 사료로 사용함은 물론 다양한 건강기능성으로 인해 건강기능 식품으로서 각광을 받고 있다.

[0004] 미세조류 중에는 건조균체의 70 ~ 80%의 많은 양의 지질을 생산하는 종이 있으며 지질의 생산 속도도 빨라서 단위 토지당 기름 생산량이 가장 많은 육상 식물인 오일팜나무보다 최소 10배 이상의 생산성을 가지고 있어서 미래에 경제적으로 신재생에너지를 생산할 수 있는 수단으로 인식되어지고 있다. 미세조류를 경제적으로 생산하기 위해서는 수확된 미세조류를 경제적으로 건조하는 기술은 필수 기술로서 미세조류의 입자가 $3 \sim 30 \mu\text{m}$ 로 작아서 일반적인 건조 방법으로는 건조가 잘되지 않아서 에너지와 경비가 많이 드는 동결건조 또는 분무건조 등을 많이 사용하고 있으나 신재생에너지와 같이 가격이 저가인 제품을 생산하기 위해서는 에너지의 사용을 최소화할 수 있는 건조 방법의 사용이 필수적으로, 경제적인 건조 방법인 자연건조방법, 열풍건조, 드럼건조기 및 콘베이어건조기를 이용한 건조방법 등이 이용되고 있다. 이와 관련하여 미국 특허 제6,524,486호는 침전, 부유 및 탈수를 포함하는 3단계 미세조류 수용액으로부터 건조된 농축 바이오매스를 수득하는 방법을 개시하고 있는데, 상기 탈수단계는 통상적인 건조실(drying room)에서 수행된다. 그러나 상기의 방법들의 경우에는 미세조류의 외피의 굳어짐 현상이 발생하여 건조가 잘 안 될 뿐 만 아니라 가장 에너지의 사용이 없는 건조 방법인 자연건조방법의 경우에는 건조기간이 길어져 부패되는 현상이 발생하기 때문에 사용이 불가능하다. 따라서, 보다 효율적인 저에너지 저비용 건조방법의 개발이 필요하다.

[0005] 특히 해수에서 생존하며 지질 함량이 높고 지질 생산속도가 빨라 신재생에너지 생산에 적합한 미세조류인 두날리엘라 종은 단단한 세포외피가 없고 점액질의 외피로 둘러싸여 있어 통상적으로 비교적 경제적인 건조방법인 자연건조, 열풍건조, 드럼건조기 및 콘베이어건조기를 사용한 건조방법으로는 건조가 어려운 단점이 있어 경제적이면서 손쉬운 미세조류의 건조 방법 개발이 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 포함하여 여러 문제점들을 해결하기 위한 것으로서, 미세조류를 바이오디젤 제조나 식품 또는 사료의 제조에 이용하는데 있어서 주요한 공정 중의 하나인 탈수 또는 건조공정과 관련하여 에너지를 적게 사용하는 미세조류의 탈수방법을 제공하는 것을 목적으로 한다. 그러나, 이러한 과제는 예시적인 것으로, 이에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

과제의 해결 수단

- [0007] 미세조류의 세포내부와 외부가 물로 채워져 있으며, 건조과정 중에 건조피막이 생겨서 건조가 지연되고, 따라서 자연건조를 사용할 때 미생물에 의해 부패가 발생하기 때문에, 본 발명자들은 기름은 제거하지 않고 선택적으로 수분을 제거하며 미세조류의 상태도 건조가 용이한 형태로 변화 시킬 수 있는 방법으로 수분과 쉽게 용해가 가능한 극성 유기용매를 사용하여 수분을 제거하되 지질은 추출되지 않는 방법을 개발하기 위해 예의 노력을 한 결과, 수분을 제거하고 건조과정 중에도 건조가 빨리 일어나며 유기용매의 작용으로 미생물의 번식이 일어나지 않아 쉽게 건조할 수 있는 방법을 완성하였다.
- [0008] 본 발명의 일 관점에 따르면, 미세조류를 1차원심분리하여 젖은 미세조류 군체를 수득하는 젖은 미세조류 군체 수득 단계; 상기 젖은 미세조류 군체에 탄소수 1 내지 3의 저급알코올을 가하고 교반하는 알코올 처리 단계; 및 알코올 처리된 미세조류를 2차원심분리한 후 상등액을 제거하여 탈수된 미세조류를 회수하는 탈수 미세조류 수득단계를 포함하는 미세조류의 탈수방법이 제공된다.
- [0009] 상기 미세조류의 탈수방법에 있어서, 상기 미세조류는 두날리엘라(*Dunaliella*), 클라미도모나스(*Chlamydomonas*), 쉼네데무스(*Scenedesmus*), 클로렐라(*Chlorella*), 유글레나(*Euglena*), 테트라셀미스(*Tetraselmis*), 보트리오크커스(*Botryococcus*), 난노클로롭시스(*Nannochloropsis*), 코코믹사(*Coccomyxa*), 패오닥티룸(*Phaeodactylum*), 시조키텐트리움(*Schizochytrium*) 및 아르스로피라(*Arthrospira*)로 구성된 군으로부터 선택되는 속 중 하나 이상일 수 있고, 상기 두날리엘라는 두날리엘라 아시도필리아(*D. acidophila*), 두날리엘라 바르다윌(*D. bardawil*), 두날리엘라 바이오쿠라타(*D. bioculata*), 두날리엘라 라테랄리스(*D. lateralis*), 두날리엘라 마리티마(*D. maritima*), 두날리엘라 미누타(*D. minuta*), 두날리엘라 파바(*D. parva*), 두날리엘라 페어세이(*D. peircei*), 두날리엘라 폴리모르파(*D. polymorpha*), 두날리엘라 프리모렉타(*D. primolecta*), 두날리엘라 슈도살리나(*D. pseudosalina*), 두날리엘라 쿼토렉타(*D. quattolecta*), 두날리엘라 살리나 테오도르(*D. salina Teodor.*), 두날리엘라 테티오렉타(*D. tertiolecta*), 두날리엘라 살리나(*D. salina*) 또는 두날리엘라 비리디스(*D. viridis*)일 수 있다.
- [0010] 상기 미세조류의 탈수방법에 있어서, 상기 1차원심분리는 2,000 내지 9,000 rpm 또는 4,000 내지 6,000 rpm의 속도로 수행될 수 있다.
- [0011] 상기 미세조류의 탈수방법에 있어서, 상기 저급알코올은 메탄올 또는 에탄올일 수 있고, 상기 저급 알코올은 젖은 미세조류 군체의 0.2 내지 5배 부피 또는 0.5 내지 2배 부피로 처리될 수 있으며, 상기 교반은 15 내지 25℃의 온도로 수행될 수 있다.
- [0012] 상기 미세조류의 탈수방법에 있어서, 상기 2차원심분리는 5,000 내지 18,000 rpm 또는 8,000 내지 12,000 rpm의 속도로 수행될 수 있다.
- [0013] 상기 미세조류의 탈수방법에 있어서, 상기 탈수 미세조류의 수득단계 이후에 상기 탈수 미세조류를 건조하는 건조단계가 추가적으로 포함될 수 있다.
- [0014] 이때, 상기 건조단계는 자연건조, 온풍건조, 열풍건조 또는 동결건조에 의해 수행될 수 있다. 특히, 본 발명의 일 실시예에 따른 미세조류의 탈수방법은 건조방법으로 에너지 소모가 적은 자연건조 또는 온풍건조 방법을 사용할 수 있다는 점에서, 식품용, 사료용 또는 바이오디젤 제조용으로 미세조류 시료를 제공하는데 매우 효율적으로 사용될 수 있다.
- [0015] 아울러, 본 발명의 일 실시예에 따르면, 저급 알코올을 젖은 미세조류 군체와 혼합하면 수분과 기타 불특정한 불순물은 제거가 되나 목적물인 지질은 군체 내에 그대로 남으며 군체도 건조가 용이한 상태가 되어 자연건조 또는 열풍건조 시 용이하게 건조된 군체를 얻을 수 있으며 수분 탈수에 사용한 메탄올은 회수하여 재사용이 가

능하다.

- [0016] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 미세조류를 1차원심분리하여 젖은 미세조류 군체를 수득하는 젖은 미세조류 군체 수득 단계; 상기 젖은 미세조류 군체에 탄소수 1 내지 3의 저급알코올을 가하고 교반하는 알코올 처리 단계; 알코올 처리된 미세조류를 2차원심분리한 후 상등액을 제거하여 탈수된 미세조류를 회수하는 탈수 미세조류 수득단계; 및 상기 탈수 미세조류균주에 촉매를 가하여 상기 균주 내에 존재하는 지방산 글리세롤을 지방산 에스터로 전환시키는 지방산 에스터 전환단계를 포함하는 바이오디젤의 생산방법이 제공된다.
- [0017] 상기 바이오디젤의 생산방법에 있어서, 상기 미세조류는 두날리엘라(*Dunaliella*), 클라미도모나스(*Chlamydomonas*), 쉼네데무스(*Scenedesmus*), 클로렐라(*Chlorella*), 유글레나(*Euglena*), 테트라셀미스(*Tetraselmis*), 보트리오크커스(*Botryococcus*), 난노클로롭시스(*Nannochloropsis*), 코코믹사(*Coccomyxa*), 패오닥티룸(*Phaeodactylum*), 시조키티리움(*Schizochytrium*) 및 아르스로피라(*Arthrospira*)로 구성된 군으로부터 선택되는 속 중 하나 이상일 수 있고, 상기 두날리엘라는 두날리엘라 아시도필리아(*D. acidophila*), 두날리엘라 바르다윌(*D. bardawil*), 두날리엘라 바이오쿠라타(*D. bioculata*), 두날리엘라 라테랄리스(*D. lateralis*), 두날리엘라 마리티마(*D. maritima*), 두날리엘라 미누타(*D. minuta*), 두날리엘라 파바(*D. parva*), 두날리엘라 페어세이(*D. peircei*), 두날리엘라 폴리모파(*D. polymorpha*), 두날리엘라 프리모렉타(*D. primolecta*), 두날리엘라 슈도살리나(*D. pseudosalina*), 두날리엘라 쿼토렉타(*D. quattolecta*), 두날리엘라 살리나 테오도르(*D. salina Teodor.*), 두날리엘라 테티오렉타(*D. tertiolecta*), 두날리엘라 살리나(*D. salina*) 또는 두날리엘라 비리디스(*D. viridis*)일 수 있다.
- [0018] 상기 바이오디젤의 생산방법에 있어서, 상기 1차원심분리는 2,000 내지 9,000 rpm 또는 4,000 내지 6,000 rpm의 속도로 수행될 수 있다.
- [0019] 상기 바이오디젤의 생산방법에 있어서, 상기 저급알코올은 메탄올 또는 에탄올일 수 있고, 상기 저급 알코올은 젖은 미세조류 군체의 0.2 내지 5배 부피 또는 0.5 내지 2배 부피로 처리될 수 있으며, 상기 교반은 15 내지 25 °C의 온도로 수행될 수 있다.
- [0020] 상기 바이오디젤의 생산방법에 있어서, 상기 2차원심분리는 5,000 내지 18,000 rpm 또는 8,000 내지 12,000 rpm의 속도로 수행될 수 있다.
- [0021] 상기 바이오디젤의 생산방법에 있어서, 상기 탈수 미세조류의 수득단계와 상기 지방산 에스터 전환단계 사이에 상기 탈수 미세조류를 건조하는 건조단계가 추가적으로 포함될 수 있다.
- [0022] 이때, 상기 건조단계는 자연건조, 온풍건조, 열풍건조 또는 동결건조에 의해 수행될 수 있다.
- [0023] 상기 바이오디젤의 생산방법에 있어서, 상기 촉매는 황산/에탄올 용액 또는 산이 처리된 바이오숯(biochar)일 수 있다.
- [0024] 상기 바이오디젤의 생산방법에 따르면, 저급 알코올을 이용하여 탈수된 미세조류 군체를 별도의 건조 공정 없이 바로 바이오디젤 제조공정에 투입되거나 자연건조나 온풍 건조와 같이 고에너지를 필요로 하지 않는 건조공정을 통해 바이오디젤 제조공정에 투입할 수 있기 때문에, 매우 경제적이고 에너지 투입을 최소화한 채로 바이오디젤을 제조할 수 있다.

발명의 효과

- [0025] 미세조류 군체를 경제적이며 간단한 방법으로 건조가 가능한 방법으로 건조를 용이하게 하여 미세조류의 이용성을 높여 바이오디젤 제조의 원료, 양어장에서의 먹이 및 건강기능 식품의 원료를 손쉽게 만들 수 있다. 그러나, 이러한 효과에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

도면의 간단한 설명

- [0026] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 동결건조 세포와 탈수세포의 바이오디젤 전환율을 나타낸 그래프이다.
- 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 메탄올 및 에탄올로 젖은 군체 탈수 시 손실되는 지질의 비율을 나타낸 그래프이다.
- 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 알코올로 젖은 군체 탈수 후 건조된 세포의 무게를 시간에 따라 나타낸 그래프이다.

도 4는 두날리엘라 터티올렉타를 탈수 처리 하지 않고 오븐 건조 시 24시간 후 발견된 균체 오염(상)과 알코올로 젖은 균체 탈수 후 오븐 건조 시 40시간 후의 균체(하) 사진이다.

도 5는 두날리엘라 터티올렉타를 메탄올 1배 부피로 탈수한 후의 건조 전의 균체를 촬영한 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

실시예 1: 두날리엘라 터티올렉타 LB 999 균체의 제조

2.5 L 원통형 버블컬럼 배양기 2대에 각각 인공해수 및 f/2 배지(표 1 MBL+f/2 배지 조성)를 2 L를 주입하고 f/2 배지에서 유지 배양한 두날리엘라 터티올렉타(*Dunaliella tertiolecta*) LB 999를 각각 100 ml 접종한 다음 20일간 2% CO₂를 포함한 공기를 0.1 vvm으로 공급하며 100 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 의 빛을 조사함으로써 20~25℃에서 증배양을 수행하였으며 70 L를 배양할 수 있는 평판형광생물 반응기(바이오트론사 제조)에 인공해수 및 f/2 배지 60 L를 주입하고 접종농도를 0.3 g/L로 하여 상기 증배양물을 접종한 다음 20일간 2% CO₂를 포함한 공기를 0.2 vvm으로 공급하며 광도 100 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 의 빛을 조사함으로써 20~25℃에서 본배양하였다. 그런 다음, 배양액을 125 mm 원심분리관이 장착된 관형 원심분리기(한일과학 J-1250)를 사용하여 7,000 RPM에서 원심분리함으로써 세포를 회수하여 1,021 g의 젖은 두날리엘라 터티올렉타 LB 999 균체를 수득하였다.

표 1

MBL+f/2 배지 조성 (1 L 기준)

화합물	사용량
NaNO ₃	0.075 g
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	0.005 g
미량 금속 용액 (Trace metal solution)	1 ml
인공해수(MBL)	1 L
미량 금속 용액 (1 L 기준)	
FeCl ₃ · 6H ₂ O	3.15 g
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	4.36 g
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.0098 g
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.0063 g
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.022 g
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.01 g
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0.018 g
인공해수 (MBL, 1 L 기준)	
NaCl	24.7 g
KCl	0.66 g
MgCl ₂ · 6H ₂ O	8.48 g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	1.9 g
MgSO ₄	3.07 g
NaHCO ₃	0.18 g

실시예 2: 탈수세포로부터 바이오디젤의 제조

상기 실시예 1에서 수득한 젖은 미세조류 균체 1066.9 mg을 5개의 샘플로 나누어 담고 동결건조하여 384.1 mg의 건조세포를 수득하였고 샘플 당 1 ml 씩 3% 황산/메탄올 용액을 넣고 65℃에서 3시간동안 바이오디젤로 직접 전환반응을 하였다. 또한 상기 실시예 1에서 수득한 젖은 미세조류 균체 1058.2 mg을 5개의 샘플로 나누어 담고 0.2 ml의 99.5% 메탄올을 넣은 후 5분간 15~25℃에서 교반(vortexing)하여 수분을 제거한 다음 10,000 RPM, 5

분간 원심분리하여 상등액과 탈수 미세조류를 분리하였다. 분리 후 샘플 당 1 ml 씩 3% 황산/메탄올 용액을 넣고 65℃에서 3시간동안 바이오피젤로 직접 전환반응을 하여 건조세포와 전환율을 비교하였다(도 1).

[0033] 그 결과, 메탄올을 이용하여 얻은 탈수 세포의 전환율은 동결건조 세포와 비교하여 차이가 거의 없었다(100.0%).

[0034] **실시예 3: 알코올 처리를 통한 미세조류의 탈수 및 건조**

[0035] 상기 실시예 1에서 수득한 젖은 균체를 50 mL 튜브 3개에 각각 5.00 g씩 정확히 정량한 후, 1개의 샘플은 비교군으로서 알코올을 첨가하지 않고, 나머지 2개의 샘플에 각각 99.5% 메탄올 5 ml와, 99.9% 에탄올 5 ml를 첨가하고 5분간 교반(vortexing) 한 후 2000 RPM 10분간 원심분리 하여 상등액을 각각 2 개의 50 ml 튜브에 분리한 후 담았다. 상등액의 지질량을 측정하고자 상등액에 1 N HCl을 0.5 ml 넣어 pH 2가 된 것을 확인한 후, 5 ml의 노르말 헥산을 투입 후 마개로 막고 20회 흔들어서 지질을 추출하였다. 노르말 헥산층을 10 ml 유리 바이알에 넣고 40℃에서 농축하여 지질의 무게를 측정한 후 세포내의 지질 양으로 나누어 주어 지질 손실율을 구하였다(도 2).

[0036] 그 결과, 메탄올을 이용하여 수분을 제거한 상등액은 지질 손실율이 0.87%로 에탄올의 지질 손실율 3.35%보다 적어, 효과적으로 지질 손실 없이 수분을 제거 할 수 있었다.

[0037] 한편, 탈수한 미세조류 균체의 건조속도를 알아보고자 1개의 비교군 샘플 및 2개의 탈수세포가 들어있는 샘플을 40℃ 하에 오븐건조 하여 시간별로 건조속도를 비교하였다(도 3).

[0038] 그 결과, 알코올을 이용하여 얻은 탈수 세포는 40시간 이내에 건조가 되었으나(도 4의 하단), 알코올 처리를 하지 않은 비교군 샘플은 24시간 후에 측정 시 오염이 발견되었으며(도 4의 상단) 70시간이 지난 후에도 완전히 건조되지 않았다.

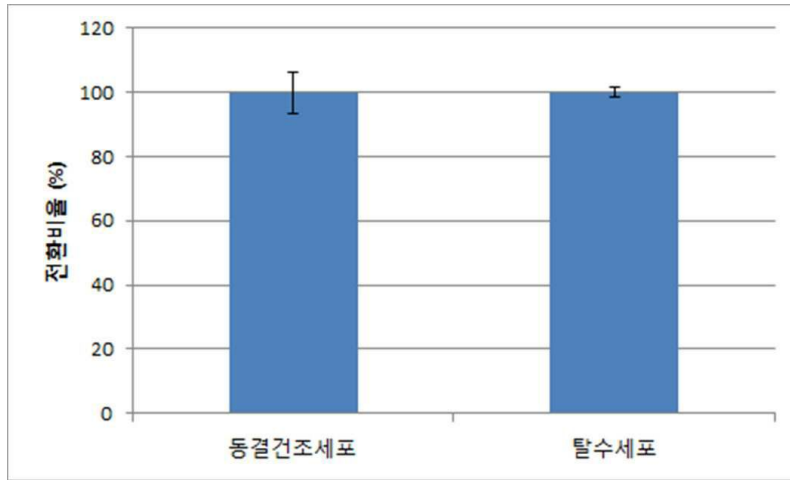
[0039] **실시예 4: 두날리엘라 터티올렉타 젖은 세포의 탈수**

[0040] 상기 실시예 1에서 수득한 젖은 미세조류 균체 954 g에 1 L의 99.5% 메탄올을 넣은 후 5분간 15~25℃에서 마그네틱 교반기를 사용하여 교반한 다음 4,500 RPM, 20분간 원심분리하여 상등액과 탈수 미세조류를 분리하였다. 탈수한 미세조류 균체의 양은 460 g이었다(도 5). 상등액의 지질량을 측정하고자 상등액에 1 N HCl을 15 ml를 첨가하여 pH 2가 된 것을 확인한 후, 2 L 분액여두에 상등액과 1000 ml 의 노르말 헥산을 투입 후 마개로 막고 분액여두를 뒤집어 흔들어서 지질을 추출하였다. 상층을 라운드 플라스크에 넣고 40℃에서 농축하여 지질의 무게를 측정하였다. 이 때 농축된 상등액의 지질량은 0.48 g로 메탄올 처리에 의해 상등액으로 손실되는 지질의 양은 미미하였다.

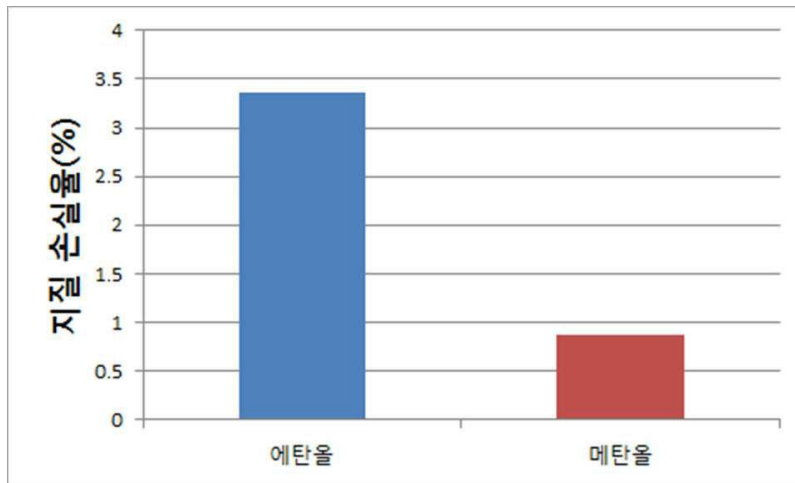
[0041] 본 발명은 상술한 실시예를 참고로 설명되었으나 이는 예시적인 것에 불과하며, 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 이로부터 다양한 변형 및 균등한 다른 실시예가 가능하다는 점을 이해할 것이다. 따라서 본 발명의 진정한 기술적 보호 범위는 첨부된 특허청구범위의 기술적 사상에 의하여 정해져야 할 것이다.

도면

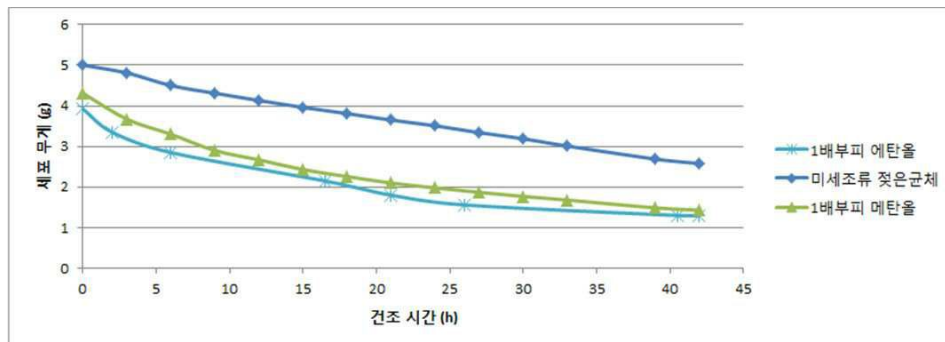
도면1



도면2



도면3



도면4



도면5

