



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0102005
(43) 공개일자 2016년08월26일

<p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C11B 1/10 (2006.01) C12P 7/64 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류 C11B 1/10 (2013.01) C12P 7/6427 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2016-7019552</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2014년12월19일 심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2015년07월19일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/IB2014/003136</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2015/092546 국제공개일자 2015년06월25일</p> <p>(30) 우선권주장 61/918,886 2013년12월20일 미국(US)</p>	<p>(71) 출원인 마라 리뉴어블즈 코퍼레이션 캐나다 노바 스코티아 비2와이 4티6 다투마우스 리서치 드라이브 101</p> <p>(72) 발명자 데니스 도로시 에이 캐나다 노바 스코티아 비3케이 2제이7 할리팩스 캐봇 플레이스 5518 아멘타 로베르트 이 캐나다 노바 스코티아 비2와이 3지1 다투마우스 크랜스톤 애비뉴 23</p> <p>(74) 대리인 제일특허법인</p>
--	--

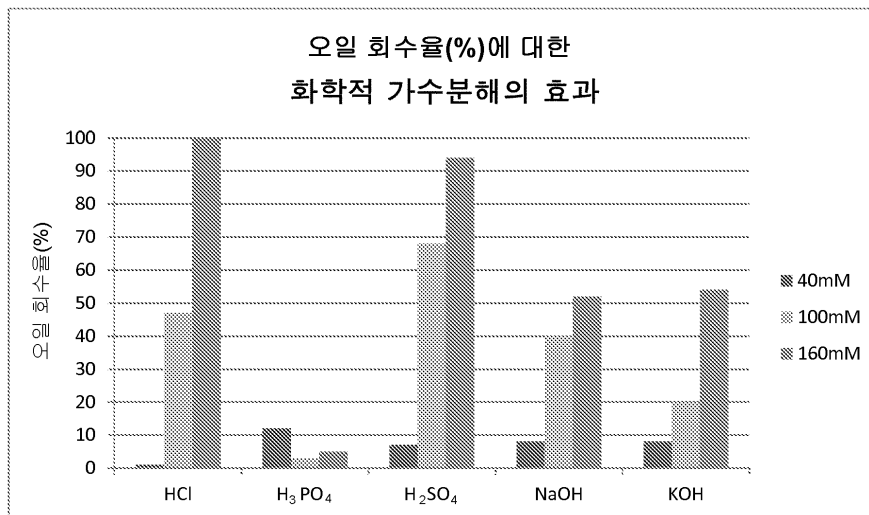
전체 청구항 수 : 총 28 항

(54) 발명의 명칭 미생물로부터 오일을 회수하는 방법

(57) 요약

본 발명은 미생물로부터 오일을 회수하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 예를 들어, 영양 오일 및/또는 지질 생물연료를 수득하는데 있어서 유용하다. 본원에 기술된 오일을 회수하는 방법은 미생물의 집단을 하나 이상의 효소와 미생물의 파괴를 유발하는 조건하에 접촉시키는 단계, 상기 파괴된 미생물을 농축시키는 단계; 및 상기 파괴된 미생물로부터 염의 존재하에 및 용매의 부재하에 고온에서 상기 파괴된 미생물로부터 지질을 추출하는 단계를 포함한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12P 7/6463 (2013.01)

C12P 7/6472 (2013.01)

Y02P 20/52 (2015.11)

명세서

청구범위

청구항 1

- (a) 미생물의 집단을 하나 이상의 효소와 상기 미생물의 파괴를 유발하는 조건하에 접촉시키는 단계;
- (b) 상기 파괴된 미생물을 농축시키는 단계; 및
- (c) 상기 파괴된 미생물로부터 고온에서 유기 용매 중에서 및 유기 용매의 부재하에 및 염의 존재하에 지질을 추출하는 단계

를 포함하는, 미생물의 집단으로부터 지질을 회수하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

접촉 단계가 5 내지 8.5의 pH에서 수행되는 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

접촉 단계가 약 50 내지 약 70℃의 온도에서 수행되는 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

접촉 단계가 1 내지 20시간 동안 수행되는 방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

접촉 단계가 1 내지 8시간 동안 수행되는 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

효소가 프로테아제인 방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

효소가 알칼라제 2.4 L인 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

효소의 농도가 0.001 내지 0.4% 용적/용적인 방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

효소의 농도가 0.05 내지 0.2% 용적/용적인 방법.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서,
접촉 단계가 약 55℃에서 1 내지 8시간 동안 0.05 내지 0.2%의 효소의 존재하에 수행되는 방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서,
접촉 단계가 계면활성제의 부재하에 수행되는 방법.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서,
접촉 단계 이전에 세포를 파괴함을 포함하는 예비-처리 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서,
농축 단계가 원심분리를 포함하는 방법.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서,
농축 단계가 25 내지 90% 수성 제거를 포함하는 방법.

청구항 15

제14항에 있어서,
농축 단계가 85% 수성 제거를 포함하는 방법.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서,
추출 단계 동안의 고온이 75 내지 95℃인 방법.

청구항 17

제16항에 있어서,
추출 단계 동안의 고온이 85℃인 방법.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서,
추출 단계 동안에 가해진 염의 농도가 1 내지 5%인 방법.

청구항 19

제18항에 있어서,
추출 단계 동안에 가해진 염의 농도가 3 내지 5%인 방법.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서,
추출 단계 동안에 가해진 염이 황산나트륨인 방법.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서,
추출 단계가 오일의 존재하에 수행되는 방법.

청구항 22

제21항에 있어서,
오일이 코코넛 오일인 방법.

청구항 23

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서,
추출 단계가 생물연료의 존재하에 수행되는 방법.

청구항 24

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서,
추출 단계가 오일 또는 생물연료의 부재하에 수행되는 방법.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서,
미생물의 집단이 조류, 진균, 세균 및 원생생물로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 26

제25항에 있어서,
미생물의 집단이 트라우스토키트리움(*Thraustochytrium*), 스킴조키트리움(*Schizochytrium*) 속 및 이들의 혼합물로부터 선택되는 방법.

청구항 27

제26항에 있어서,
미생물의 집단이 ATCC 수탁 번호 제PTA-6245호로 기탁된 트라우스토키트리움(*Thraustochytrium*) 종인 방법.

청구항 28

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서,
지질이 도코사헥사엔산을 포함하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] **관련 출원의 교차 참조**

[0002] 본원은 2013년 12월 20일자로 출원된 미국 가출원 제61/918,886호를 우선권 주장하고, 이의 전문이 본원에 참고로 포함된다.

배경 기술

[0003] 오일은 습윤 추출 방법 또는 건조 추출 방법을 사용하여 조류와 같은 미생물로부터 회수할 수 있다. 건조 추출 방법에서, 미생물은 전형적으로 오일 추출 전에 수거되어 건조된다. 그러나, 건조는 비용이 많이 들고 에너지 소모성인 공정이다. 또한, 오일이 다중불포화된 지방산(PUFA)(예를 들어, 식품 및 영양 보충물 적용의 경우)에 농축되어 있는 경우, 상기 공정은 건조시 포함되는 고온으로 인하여 PUFA의 유의적인 산화를 유발할 수 있다.

[0004] 또한, 미생물로부터 오일을 회수하는 건조 추출 방법은 전형적으로 헥산과 같은 유기 용매를 사용하여 수행되며, 적합한 오일 수득을 위해 기계적인 세포 파괴 방법과 커플링(coupling)할 필요가 있다. 그러나, 기계적인 파괴 방법은 비싸고 에너지 집약적인 반면, 유기 용매는 가연성이고, 독성이며, 최종 오일 생성물로부터 반드시 회수되어야 한다.

발명의 내용

[0005] 본원에는 미생물로부터 오일(예를 들어, 지질)을 회수하는 습식 무용매 방법이 제공된다. 상기 방법은 예를 들어, 영양 오일 및/또는 지질 생물연료를 수득하는데 있어서 유용하다. 본원에 기술된 오일을 회수하는 방법은 임의로 통합 생물공정, 즉, "원-포트(one-pot)" 방법으로서 수행될 수 있다.

[0006] 본원에 기술된 미생물의 집단으로부터 지질을 회수하는 방법은 미생물의 집단을 하나 이상의 효소와 상기 미생물의 파괴를 유발하는 조건하에 접촉시키고, 상기 파괴된 미생물을 농축시키며, 고온에서 염의 존재하에 및 유기 용매의 부재하에 상기 파괴된 미생물로부터 지질을 추출하는 단계를 포함한다. 임의로, 상기 접촉 단계는 발효 배지 속에서 일어난다. 임의로, 상기 접촉 단계는 5 내지 8.5 사이 및 이를 포함하는 pH(예를 들어, 약 8)에서 수행될 수 있다. 상기 접촉 단계는 약 50 내지 약 70°C 사이 및 이를 포함하는 온도에서 임의로 수행된다. 상기 접촉 단계는 포괄적으로 1 내지 20시간 동안(예를 들어, 1 내지 8시간 동안, 또는 4시간 동안) 수행될 수 있다.

[0007] 임의로, 상기 접촉 단계에서 사용된 효소는 프로테아제이다. 효소는 임의로 알칼라제 2.4 L이다. 임의로, 상기 효소는, 약 0.001 내지 0.4%의 용적/용적(포괄적으로)(예를 들어, 0.05 내지 0.2%, 또는 약 0.05, 0.1 또는 0.2%)의 농도에 있다. 상기 접촉 단계는 임의로 0.05 내지 0.2%(포괄적으로) 효소의 존재하에 55°C에서 1 내지 8시간 동안 및 이를 포함하는 동안 수행될 수 있다. 예를 들어, 상기 접촉 단계는 0.1%의 효소의 존재하에 55°C에서 4시간 동안 수행될 수 있다. 임의로, 상기 접촉 단계는 0.05%의 효소의 존재하에 55°C에서 6시간 동안 수행된다. 상기 pH는 상기 접촉 단계 동안 약 8.0의 pH로 적정될 수 있다.

[0008] 임의로, 상기 접촉 단계는 통기에 의해 또는 재순환에 의해 발생하는 혼합을 포함할 수 있다. 임의로, 상기 혼합은 교반에 의해 일어나지 않는다.

[0009] 상기 접촉 단계는 계면활성제의 부재하에 수행될 수 있다. 임의로, 미생물의 집단은 상기 접촉 단계 전에 농축되지 않는다. 상기 방법은 예비-처리 단계를 추가로 포함할 수 있으며, 여기서 상기 예비-처리 단계는 세포를 상기 접촉 단계 전에 파괴시킴을 포함한다. 예비-처리 단계는 화학적, 기계적, 또는 효소적 세포 파괴 방법을 사용하여 수행할 수 있다.

[0010] 상기 농축 단계는 원심분리를 임의로 포함한다. 임의로, 상기 농축 단계는 25 내지 95%의 수성 제거를 포괄적으로(예를 들어, 50 내지 95% 또는 85% 수성 제거) 포함한다.

[0011] 상기 접촉 단계 동안 고온은 55 내지 95°C(예를 들어, 75 내지 95°C, 또는 85°C 또는 90°C)일 수 있다. 임의로, 상기 추출 단계 동안 가해진 염의 농도는 1 내지 5% 또는 3 내지 5%(예를 들어, 3% 또는 5%)로 존재하며 이를 포함한다. 상기 추출 단계에서 염은 황산나트륨일 수 있다. 지질의 적어도 80%가 파괴된 미생물로부터 추출될 수 있다. 상기 추출 단계는 오일(예를 들어, 코코넛 오일) 또는 생물연료의 존재하에 수행될 수 있거나 오일 또는 생물연료의 부재하에 수행될 수 있다.

[0012] 임의로, 본원에 기술된 미생물의 집단으로부터 지질을 추출하는 방법에는 저온살균 단계가 없다. 임의로, 본원에 기술된 미생물의 집단으로부터 지질을 추출하는 방법에는 건조 단계가 없다.

[0013] 미생물의 집단은 조류, 진균, 세균 및 원생생물로 이루어진 군으로부터 선택된다. 임의로, 미생물의 집단은 트라우스토키트리움(*Thraustochytrium*), 스킨조키트리움(*Schizochytrium*) 속, 또는 이들의 혼합물로부터 선택된다. 임의로, 상기 미생물의 집단은 예를 들어, ATCC 수탁번호 제PTA-6245호로 기탁된, 트라우스토키트리움(*Thraustochytrium*) 종이다.

[0014] 하나 이상의 구현예의 세부사항은 도면 및 하기 설명에 제시되어 있다. 다른 특징, 목적, 및 장점은 설명 및 도면, 및 청구범위로부터 명백할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 40mM(좌측 막대), 100mM(중간 막대), 및 160mM(우측 막대)의 염산, 인산, 황산, 수산화나트륨, 및 수산

화칼륨으로 가수분해된 세포로부터 회수된 오일의 퍼센트를 나타내는 그래프이다.

도 2는 0.2%(좌측 막대) 및 0.4%(우측 막대)의 비스코자임, 알칼라제, 플라보르자임, 및 만나웨이 효소로 효소적으로 가수분해된 세포로부터 회수된 오일의 퍼센트를 나타내는 그래프이다.

도 3은 40mM H₂SO₄, 160mM H₂SO₄, 및 0.2%(v/v) 알칼라제로 가수분해 후 세척되지 않은(좌측 막대) 및 세척된(우측 막대) 세포로부터 회수된 오일의 퍼센트를 나타내는 그래프이다.

도 4는 55°C에서 18시간 동안 및 70°C에서 4시간 동안 효소적으로 가수분해된 세포로부터 회수된 오일의 퍼센트를 나타내는 그래프이다.

도 5는 TG 조류 오일, 생물연료 및 EE 조류 오일의 지질 부류 프로파일을 나타내는 그래프이다.

도 6은 0.4%(v/v) 알칼라제로 55°C에서 18시간 동안 가수분해된 바이오매스(biomass) 공급물, 55°C에서 원심분리 후 농축되고 가수분해된 바이오매스, 및 55°C에서 원심분리된 후에 배지(좌측에서 우측으로)의 묘사이다.

도 7a는 Na₂SO₄ 및 90°C 가열로 처리한, 농축되고 가수분해된 바이오매스 공급물의 묘사이다.

도 7b는 90°C에서 원심분리 후 소비된 바이오매스(좌측) 및 90°C에서 원심분리 후 회수된 오일(우측)을 나타내는 사진이다.

도 8은 가수분해 시간의 함수로서 55°C 및 pH 8.0에서 0.1%(v/v) 알칼라제를 사용한 효소적 가수분해 후 세포로부터 회수된 오일의 퍼센트 및 배지속의 아미노산 농도를 나타내는 그래프이다.

도 9는 가수분해 시간의 함수로서 55°C 및 pH 8.0에서 0.05%(v/v) 알칼라제를 사용한 효소적 가수분해 후 세포로부터 회수된 오일의 퍼센트 및 배지속의 아미노산 농도를 나타내는 그래프이다.

도 10은 pH 3.5, 4.5, 5.5, 6.5, 7.5, 및 8.0에서 효소적으로 가수분해된 세포로부터 회수된 오일의 퍼센트를 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 본원에는 미생물 집단으로부터 지질을 회수하는 습식 무용매 방법이 제공된다. 지질을 회수하는 방법은 미생물의 집단을 하나 이상의 효소와 미생물의 파괴를 유발하는 조건하에 접촉시키는 단계, 상기 파괴된 미생물을 농축시키는 단계, 및 상기 파괴된 미생물로부터 지질을 추출하는 단계를 포함한다. 세포 파괴는 습식이다. 상기 추출은 고온에서, 염의 존재 및 용매의 부재하에 수행된다. 본원에 기술된 방법은, 미생물 오일 생산 및 임의로 오일을 방출시키기 위한 세포 파괴가 동일한 용기 내에서 수행될 수 있으므로, "원-포트" 또는 "통합된" 공정으로 본원에서 언급될 수 있다. 따라서, 하향 공정 단계(downstream processing steps)(예를 들어, 오일 추출 및 회수)는 상향(upstream) 공정 단계(예를 들어, 발효)의 말기에 통합될 수 있다.

[0017] **I. 미생물**

[0018] 본원에 기술된 방법은 미생물의 집단으로부터 지질을 회수함을 포함한다. 본원에 기술된 미생물의 집단은 조류(미세조류 포함), 진균(효모 포함), 세균, 또는 원생생물을 포함한다. 임의로, 미생물은 트라우스토키트리알레스(*Thraustochytriales*) 목의 트라우스토키트리드(*Thraustochytrid*), 보다 구체적으로 트라우스토키트리움 및 스키토키트리움 속의 트라우스토키트리알레스를 포함한다. 임의로, 미생물의 집단은, 이의 전문이 본원에 참고로 포함된 미국 특허 제5,340,594호 및 제5,340,742호에 기술된 바와 같은 트라우스토키트리알레스를 포함한다. 상기 미생물은 ATCC 수탁번호 제PTA-6245호(즉, ONC-T18)로서 기탁된 트라우스토키트리움 종과 같은 트라우스토키트리움 종일 수 있다.

[0019] 본원에 기술된 방법에 사용하기 위한 미생물은 다양한 지질 화합물을 생산할 수 있다. 본원에 사용된 것으로서, 용어 "지질"은 인지질, 유리 지방산, 지방산의 에스테르, 트리아실글리세롤, 스테롤 및 스테롤 에스테르, 카로테노이드, 크산토피(예를 들어, 옥시카로테노이드), 탄화수소, 및 당해 분야의 통상의 기술자에게 공지된 다른 지질을 포함한다.

[0020] 임의로, 지질 화합물은 포화, 단포화, 및/또는 다포화 지방산을 포함한다.

[0021] 임의로, 지질 화합물은 불포화 지질을 포함한다. 상기 불포화 지질은 다중불포화된 지질(즉, 적어도 2개의 불포화 탄소-탄소 결합, 예를 들어, 이중 결합을 함유하는 지질) 또는 고도로 불포화된 지질(즉, 4개 이상의 불포화 탄소-탄소 결합을 함유하는 지질)을 포함할 수 있다. 불포화된 지질의 예는 오메가-3 및/또는 오메가-6 불포화

지방산, 예를 들어, 도코사헥사엔산(즉, DHA), 에이코사펜타엔산(즉, EPA), 및 다른 천연적으로 존재하는 불포화된, 다중불포화된, 및 고도로 불포화된 화합물을 포함한다.

[0022] II. 공정

[0023] 발효

[0024] 본원에 기술된 미생물은 당해 분야에 공지된 방법에 따라 배양될 수 있다. 예를 들어, 트라우스토키트리드, 예를 들어, 트라우스토키트리움 종을 이의 전문이 본원에 참고로 포함된, 미국 특허출원공개 제US 2009/0117194호 또는 제US 2012/0244584호에 기술된 방법에 따라 배양할 수 있다. 미생물은 성장 배지(또한 "배양 배지"로 공지됨) 속에서 성장된다. 다양한 배지 중 어느 것도 본원에 기술된 미생물을 배양하는데 사용하기에 적합할 수 있다. 임의로, 배지는 미생물에 대해 탄소원 및 질소원을 포함하는, 다양한 영양 성분을 공급한다.

[0025] 임의로, 본원에 제공된 미생물은 바이오매스 및/또는 목적인 화합물(예를 들어, 오일 또는 총 지방산(TFA) 내용물)의 생산을 증가시키는 조건하에 배양된다. 예를 들어, 트라우스토키트리드는 전형적으로 염수 배지 속에서 배양된다. 임의로, 트라우스토키트리드는, 염 농도가 약 2.0 내지 약 50.0g/L인 배지 속에서 배양할 수 있다. 임의로, 트라우스토키트리드는, 염 농도가 약 2 내지 약 35g/L(예를 들어, 약 18 내지 약 35g/L)인 배지 속에서 배양된다. 임의로, 본원에 기술된 트라우스토키트리드는 저 염 조건에서 배양시킬 수 있다. 예를 들어, 트라우스토키트리드는, 염 농도가 5 내지 약 20g/L(예를 들어, 약 5 내지 약 15g/L)인 배지 속에서 배양시킬 수 있다. 상기 배양 배지는 NaCl을 임의로 포함한다. 임의로, 상기 배지는 천연 또는 인공 바다 염 및/또는 인공 해수를 포함한다.

[0026] 배양 배지 속의 클로라이드 농도는 전통적인 방법과 비교하여 감소(즉, 양에 있어서 보다 적은 양)될 수 있다. 상기 배양 배지는 나트륨원으로서 비-클로라이드-함유 나트륨 염(예를 들어, 황산나트륨)을 포함할 수 있다. 예를 들어, 총 나트륨의 유의적인 비율은 비-클로라이드 염에 의해 공급되어 배양 배지 중 약 100%, 75%, 50%, 또는 25% 미만의 총 나트륨이 염화나트륨에 의해 공급되도록 할 수 있다.

[0027] 임의로, 배양 배지는, 클로라이드 농도가 약 3g/L, 500mg/L, 250mg/L, 또는 120mg/L 미만이다. 예를 들어, 배양 배지는, 클로라이드 농도가 약 60 내지 120mg/L 및 이를 포함한다. 본 발명의 방법에 따라 사용하기에 적합한 비-클로라이드 나트륨 염의 예는 소다 회(탄산나트륨과 산화나트륨의 혼합물), 탄산나트륨, 중탄산나트륨, 황산나트륨, 및 이들의 혼합물을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 예로, 미국 특허 제5,340,742호 및 제 6,607,900호를 참조하며, 이들 각각의 전체 내용은 참고로 본원에 포함되어 있다.

[0028] 트라우스토키트리드 배양을 위한 배지는 다양한 탄소원 중 어느 하나를 또한 포함할 수 있다. 탄소원의 예는 지방산; 지질; 글리세롤; 트리글리세롤; 글루코즈, 전분, 셀룰로즈, 헤미셀룰로즈, 프락토즈, 텍스트로즈, 크실로즈, 락토로즈, 갈락토즈, 말토트리즈, 말토즈, 락토즈, 글리코젠, 젤라틴, 전분(옥수수 또는 밀), 아세테이트, m-이노시톨(옥수수대 액으로부터 기원함), 갈락투론산(펙틴으로부터 기원함), L-푸코즈(갈락토즈로부터 기원함), 겐티오비오스, 글루코사민, 알파-D-글루코즈-1-포스페이트(글루코즈로부터 기원함), 셀룰로비오스, 텍스트린, 및 알파-사이클로덱스트린(전분으로부터 기원함)과 같은 탄수화물; 슈크로즈(몰라세스로부터 기원함); 말티톨과 같은 폴리올, 글리세롤 및 트윈 80과 같은 에리트ρί톨, 아도니톨 및 올레산; N-아세틸-D-갈락토사민, N-아세틸-D-글루코사민 및 N-아세틸-제타-D-만노사민과 같은 아미노 당; 및 임의의 종류의 바이오매스 또는 펄프 스트림을 포함한다.

[0029] 임의로, 배지는 약 5 내지 약 200g/L의 농도의 탄소원을 포함한다. 배지는, C:N(탄소 대 질소)의 비가 약 1:1 내지 약 40:1일 수 있다. 2상 배양을 사용하는 경우, 배지는, C:N의 비가 제1상의 경우 약 1:1 내지 약 5:1, 이후에 제2상의 경우 약 1:1 내지 약 1: 약 0(즉, 질소가 함유되지 않거나 최소임) 및 이들 범위를 포함할 수 있다. 본원에 사용된 것으로서, 용어 "최소"는 약 10%(예를 들어, 약 9% 미만, 약 8% 미만, 약 7% 미만, 약 6% 미만, 약 5% 미만, 약 4% 미만, 약 3% 미만, 약 2% 미만, 약 1% 미만, 약 0.9% 미만, 약 0.8% 미만, 약 0.7% 미만, 약 0.6% 미만, 약 0.5% 미만, 약 0.4% 미만, 약 0.3% 미만, 약 0.2% 미만, 또는 약 0.1% 미만)를 말한다. 예를 들어, 배지중 최소 질소는 배지 중 약 10% 미만(예를 들어, 약 9% 미만, 약 8% 미만, 약 7% 미만, 약 6% 미만, 약 5% 미만, 약 4% 미만, 약 3% 미만, 약 2% 미만, 약 1% 미만, 약 0.9% 미만, 약 0.8% 미만, 약 0.7% 미만, 약 0.6% 미만, 약 0.5% 미만, 약 0.4% 미만, 약 0.3% 미만, 약 0.2% 미만, 또는 약 0.1% 미만)의 질소를 말할 수 있다.

[0030] 트라우스토키트리드 배양용 배지는 다양한 질소원 중의 어느 하나를 또한 포함할 수 있다. 예시적인 질소원은 암모늄 용액(예를 들어, H₂O 중 NH₄), 암모늄 또는 아민 염(예를 들어, (NH₄)₂SO₄, (NH₄)₃PO₄, NH₄NO₃,

$\text{NH}_4\text{OOCCH}_2\text{CH}_3(\text{NH}_4\text{Ac})$), 펩톤, 트립톤, 효모 추출물, 맥아 추출물, 어분(fish meal), 글루탐산나트륨, 대두 추출물, 카사미노산 및 증류 낱알(distiller grain)을 포함한다. 적합한 배지 중 질소원의 농도는 전형적으로 약 1 내지 약 25g/L 및 당해 범위를 포함한다.

[0031] 배지는 임의로 인산칼륨 또는 인산나트륨과 같은 인산염을 포함한다. 배지 중 무기 염 및 미량의 영양소는 황산 암모늄, 중탄산나트륨, 오르토바나드산나트륨, 크롬산칼륨, 몰리브덴산나트륨, 셀렌산, 황산니켈, 황산구리, 황산아연, 염화코발트, 염화철, 염화망간, 염화칼륨, 및 EDTA를 포함할 수 있다. 피리독신 하이드로클로라이드, 티아민 하이드로클로라이드, 칼슘 판토테네이트, p-아미노벤조산, 리보플라빈, 니코틴산, 바이오틴, 엽산 및 비타민 B12와 같은 비타민도 포함될 수 있다.

[0032] 배지의 pH는 산 또는 염기를 사용하고/하거나, 경우에 따라 질소원을 사용하여 3.0 내지 10.0 및 당해 범위를 포함하도록 조절할 수 있다. 임의로, 배지는 pH 4.0 내지 6.5, 및 당해 범위를 포함하도록 조절된다. 배지는 멸균될 수 있다.

[0033] 일반적으로, 미생물의 배양을 위해 사용된 배지는 액체 배지이다. 그러나, 미생물의 배양을 위해 사용된 배지는 고체 배지일 수 있다. 본원에 논의된 바와 같은 탄소 및 질소원 외에도, 고체 배지는 구조적 지지체를 제공하고/하거나 배지가 고체형으로 되도록 하는 하나 이상의 성분(예를 들어, 아가 또는 아가로즈)을 함유할 수 있다.

[0034] 세포는 1일 내지 60일 동안의 임의의 시간 동안에도 배양될 수 있다. 임의로, 배양은 14일 이하, 13일 이하, 12일 이하, 11일 이하, 10일 이하, 9일 이하, 8일 이하, 7일 이하, 6일 이하, 5일 이하, 4일 이하, 3일 이하, 2일 이하, 또는 1일 이하 동안 수행된다. 배양은 약 4 내지 약 30°C, 예를 들어, 약 18 내지 약 28°C의 온도에서 임의로 수행된다. 배양은 통기-진탕 배양, 진탕 배양, 정지 배양(stationary culture), 회분 배양(batch culture), 반-연속 배양, 연속 배양, 롤링 회분 배양(rolling batch culture), 파동 배양(wave culture) 등을 포함할 수 있다. 배양은 통상의 교반-발효기, 거품 컬럼 발효기(bubble column fermenter)(회분 또는 연속 배양), 파동 발효기 등을 사용하여 수행될 수 있다.

[0035] 배양물은 진탕을 포함하는, 하나 이상의 다양한 방법에 의해 통기시킬 수 있다. 임의로, 진탕은 약 100 내지 약 1000rpm, 예를 들어, 약 350 내지 약 600rpm 또는 약 100 내지 약 450rpm의 범위이다. 임의로, 배양물은 바이오매스를 생산하는 상 동안 및 지질을 생산하는 상 동안에 상이한 진탕 속도를 사용하여 통기된다. 달리는 또는 추가로, 진탕 속도는 배양 용기의 유형(예를 들어, 플라스크의 유형 또는 크기)에 따라 변할 수 있다.

[0036] 임의로, 용존 산소(DO)의 수준은, 이것이 지질 생산 상 동안인 경우보다 바이오매스 생산 상 동안에 더 높다. 따라서, DO 수준은 지질 생산 상(즉, DO 수준은 바이오매스 생산 상에서 용존 산소의 양보다 더 적다) 동안 감소된다. 임의로, 용존 산소의 수준은 포화 이하로 감소된다. 예를 들어, 용존 산소의 수준은 매우 낮은, 또는 심지어 검출불가능한 수준으로 감소될 수 있다.

[0037] 바람직한 지질의 생산은 바람직한 화합물의 보다 많은 양을 수득하기 위하여 하나 이상의 배양 조건의 이동(shift)을 포함하는 방법에 따라 세포를 배양함으로써 향상시킬 수 있다. 임의로, 세포는 바이오매스를 극대화시키는 조건에 이어서, 하나 이상의 배양 조건을 지질 생산성에 양호한 조건으로 이동시킴으로써 우선 배양한다. 이동되는 조건은 산소 농도, C:N 비, 온도, 및 이의 조합을 포함할 수 있다. 임의로, 제1 단계가 바이오매스 생산(예를 들어, 높은 산소 조건(제2 단계에 대해 일반적으로 상대적으로), 낮은 C:N 비, 및 주위 온도)을 선호하고, 이어서 지질 생산(예를 들어, 여기서 산소는 감소되고, C:N 비는 증가하며 온도는 감소한다)을 선호하는 제2 단계를 수반하는, 2단계 배양을 수행한다.

[0038] *저온살균(Pasteurization)*

[0039] 임의로, 생성되는 바이오매스는 저온살균시켜 세포를 사멸시키고 바이오매스 속에 존재하는 바람직하지 않은 물질을 불활성화시킨다. 예를 들어, 바이오매스를 저온살균시켜 물질을 분해시키는 화합물을 불활성화시킬 수 있다. 바이오매스는 발효 배지 속에 존재할 수 있거나 저온살균 단계용 발효 배지로부터 분리할 수 있다. 저온살균 단계는 바이오매스 및/또는 발효 배지를 고온으로 가열함으로써 수행할 수 있다. 예를 들어, 바이오매스 및/또는 발효 배지를 약 55 내지 약 121°C 및 이를 포함하는 온도(예를 들어, 약 55 내지 약 90°C 및 이를 포함하거나 약 65 내지 약 80°C 및 이를 포함하는 온도)로 가열할 수 있다. 임의로, 바이오매스 및/또는 발효 배지는 약 4분 내지 약 120분 및 이를 포함하는 범위(예를 들어, 약 30분 내지 약 120분, 또는 약 45분 내지 약 90분, 또는 약 55분 내지 약 75분 및 이를 포함하는 범위)로 가열할 수 있다. 저온살균은 직접적인 증기 주입(steam injection)에 의해서와 같이, 당해 분야의 숙련가에게 공지된 적합한 가열 수단을 사용하여 수행할 수 있다.

- [0040] 임의로, 저온살균 단계가 수행되지 않는다(즉, 상기 방법에 저온 살균 단계가 결여되어 있다).
- [0041] 수거 및 세척
- [0042] 임의로, 바이오매스는 당해 분야의 숙련자에게 공지된 방법에 따라 수거할 수 있다. 예를 들어, 바이오매스는 원심분리(예를 들어, 고체-배출 원심분리(solid-ejecting centrifuge)) 또는 여과(예를 들어, 교차-유동 여과)와 같은 다양한 통상의 방법을 사용하여 발효 배지로부터 임의로 수집될 수 있고 또한 세포 바이오매스의 가속화된 수집을 위한 침전제(예를 들어, 인산나트륨 또는 염화칼슘)의 사용을 포함할 수 있다.
- [0043] 임의로, 바이오매스는 물로 세척한다. 임의로, 바이오매스는 약 30% 이하의 고체로 농축시킬 수 있다. 예를 들어, 바이오매스는 약 5 내지 약 30% 및 이를 포함하는 고체, 약 7.5 내지 약 15% 및 이를 포함하는 고체, 또는 약 15 내지 약 20% 및 이를 포함하는 고체, 또는 언급한 범위 내의 임의의 퍼센트의 고체로 농축시킬 수 있다. 임의로, 바이오매스는 약 30% 이하의 고체, 약 29% 이하의 고체, 약 28% 이하의 고체, 약 27% 이하의 고체, 약 26% 이하의 고체, 약 25% 이하의 고체, 약 24% 이하의 고체, 약 23% 이하의 고체, 약 22% 이하의 고체, 약 21% 이하의 고체, 약 20% 이하의 고체, 약 19% 이하의 고체, 약 18% 이하의 고체, 약 17% 이하의 고체, 약 16% 이하의 고체, 약 15% 이하의 고체, 약 14% 이하의 고체, 약 13% 이하의 고체, 약 12% 이하의 고체, 약 11% 이하의 고체, 약 10% 이하의 고체, 약 9% 이하의 고체, 약 8% 이하의 고체, 약 7% 이하의 고체, 약 6% 이하의 고체, 약 5% 이하의 고체, 약 4% 이하의 고체, 약 3% 이하의 고체, 약 2% 이하의 고체, 또는 약 1% 이하의 고체로 농축시킬 수 있다.
- [0044] 가수분해
- [0045] 세포 가수분해(즉, 세포 파괴)는 화학적, 효소적, 및/또는 기계적 방법을 사용하여 수행할 수 있다. 임의로, 본원에 기술된 방법에는 건조 단계가 없다. 임의로, 바이오매스는 세포 가수분해 전에 건조되지 않는다. 임의로, 바이오매스는 발효가 완료되고 접촉 단계 전에 농축되지 않는다.
- [0046] 세포를 가수분해하기 위한 화학적 방법은 산을 세포에 첨가함을 포함할 수 있으며, 이는 본원에서 산 가수분해로 언급된다. 산 가수분해 방법에서, 바이오매스는 예를 들어, 원심분리를 사용하여 물로 세척할 수 있으며, 세포를 가수분해하기 전에 위에서 기술한 바와 같이 농축시킬 수 있다. 임의로, 바이오매스는 물을 사용하여 약 15%의 고체로 농축시킨다.
- [0047] 이후에, 세척된, 습윤 바이오매스에 산을 가한다. 임의로, 바이오매스는 산을 첨가하기 전에 건조되지 않는다. 산 가수분해 단계에서 사용하기에 적합한 산은 황산, 염산, 인산, 브롬화수소산, 질산, 과염소산, 및 당해 분야의 숙련자에게 공지된 바와 같은 다른 강산을 포함한다. 적합한 양의 산을 세척된, 습윤 바이오매스에 가하여 약 100 내지 약 200mM 및 이를 포함하는 최종 농도(예를 들어, 약 120 내지 약 180mM 및 이를 포함하는 최종 농도 또는 약 140 내지 약 160mM 및 이를 포함하는 최종 농도)를 달성할 수 있다. 황산을 세척된, 습윤 바이오매스에 160mM의 최종 농도로 가할 수 있다.
- [0048] 물, 바이오매스, 및 산을 포함하는 생성되는 혼합물은 이후에 세포를 가수분해시키기에 충분한 기간 동안 항온처리할 수 있다. 임의로, 혼합물은 약 30 내지 약 200°C 및 이를 포함하는 온도에서 항온처리할 수 있다. 예를 들어, 상기 혼합물은 약 45 내지 약 180°C 및 이를 포함하는 온도, 약 60 내지 약 150°C 및 이를 포함하는 온도, 또는 약 80 내지 약 130°C 및 이를 포함하는 온도에서 항온처리할 수 있다. 임의로, 혼합물은 오토클레이브(autoclave) 속에서 121°C의 온도에서 항온처리한다. 혼합물은 세포의 적어도 50%(예를 들어, 세포의 적어도 60%, 세포의 적어도 70%, 세포의 적어도 80%, 세포의 적어도 90%, 세포의 적어도 95%, 또는 세포의 100%)를 가수분해시키기에 적합한 기간 동안 항온처리할 수 있다. 세포를 항온처리하는 기간은 항온처리 온도에 의존한다. 보다 높은 온도에서 혼합물을 항온처리하면 가수분해를 보다 빠른 속도(즉, 가수분해를 위한 보다 짧은 기간을 필요로 함)에서 진행시킬 수 있다. 일부 예에서, 세포는 60°C에서 1시간 동안 항온처리할 수 있다.
- [0049] 위에 기술된 바와 같이, 세포 가수분해(즉, 세포 파괴)는 효소 방법을 사용하여 수행할 수 있다. 구체적으로, 미생물의 집단은 미생물의 파괴를 유발하는 조건하에 하나 이상의 효소와 접촉시킬 수 있다. 임의로, 효소는 프로테아제이다. 적합한 프로테아제의 예는 알칼라제 2.4 L FG(제조원: 노쓰 캐롤라이나 프랭클린 소재의 Novozymes)이다. 임의로, 세포는 효소 가수분해 전에 물로 세척하지 않는다. 임의로, 미생물의 집단은 효소 가수분해 전에 농축되지 않는다.
- [0050] 미생물을 하나 이상의 효소와 접촉시키기 전에, 발효 배지의 pH는 약 5 내지 8.5 및 이를 포함하는 pH, 예를 들어, 약 5.5 내지 8.0 및 이를 포함하는 pH 또는 약 6.5 내지 7.5 및 이를 포함하는 pH, 또는 인용된 범위내 어

떠한 값으로 임의로 조절할 수 있다. 예를 들어, 발효 배지의 pH는 5.0, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7.0, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9, 8.0, 8.1, 8.2, 8.3, 8.4, 또는 8.5로 임의로 조절할 수 있다. pH는 예를 들어, 수산화나트륨(예를 들어, 1N NaOH), 수산화암모늄, 수산화칼슘, 수산화마그네슘, 또는 수산화칼륨과 같은 염기를 사용하여 조절할 수 있다. 발효 배지의 pH는 또한 접촉 단계 동안 조절될 수 있다. 임의로, pH는 상기 접촉 단계 동안 약 8.0의 pH로 조절될 수 있다.

[0051] 미생물은, 미생물의 집단이 발효 배지 속에 있는 동안 하나 이상의 효소와 접촉시킬 수 있다(즉, 접촉 단계는 발효 배지 속에서 일어난다). 임의로, 발효 배지는 발효 후, 그리고 접촉 단계 전에 농축된다. 임의로, 발효 배지는 발효 후, 그리고 접촉 단계 전에 희석된다. 임의로, 발효 배지에 첨가된 효소는 약 0.001 내지 약 0.4% 용적/용적(v/v)의 농도이다. 예를 들어, 발효 배지에 첨가된 효소는 0.05 내지 0.4%(v/v), 0.05 내지 0.2%(v/v), 또는 0.1 내지 0.2%(v/v)의 농도일 수 있다. 일부 예시에서, 발효 배지에 첨가된 효소는 0.05%(v/v), 0.1%(v/v), 0.15%(v/v), 0.2%(v/v), 0.25%(v/v), 0.30%(v/v), 0.35%(v/v), 또는 0.4%(v/v)의 농도일 수 있다.

[0052] 상기 접촉 단계는 약 45°C 이하의 온도에서 수행할 수 있다. 임의로, 상기 접촉 단계는 약 45 내지 약 70°C 및 이를 포함하는 온도, 약 50 내지 70°C 및 이를 포함하는 온도, 또는 약 55 내지 70°C 및 이를 포함하는 온도 또는 55°C에서 수행한다. 상기 접촉 단계는 미생물의 파괴를 생성하기에 적합한 기간 동안 수행할 수 있다. 예를 들어, 상기 접촉 단계는 약 1 내지 약 20시간 및 이를 포함하는 기간, 예를 들어, 1 내지 18시간, 1 내지 6시간, 4 내지 6시간, 또는 인용된 범위내 어떠한 시간범위 동안 수행할 수 있다. 임의로, 상기 접촉 단계는 약 4시간 동안 수행될 수 있다.

[0053] 최적 온도, 시간, pH, 및 효소 농도는 특수한 효소에 의존하며, 당해 분야의 통상의 기술자는 제공된 효소에 적절한 것으로서 온도, 시간, pH, 및 효소 농도를 조절할 수 있다.

[0054] 임의로, 상기 접촉단계는 약 0.05%(v/v) 또는 약 0.2%(v/v)의 효소의 존재하에 약 1 내지 6시간 동안 약 55°C에서 수행한다. 예를 들어, 상기 접촉 단계는 0.1%(v/v) 효소의 존재하에 55°C에서 4시간 동안 수행될 수 있다. 임의로, 상기 접촉 단계는 계면활성제의 부재(즉, 계면활성제는 존재하지 않음)하에 수행한다.

[0055] 임의로, 상기 세포 파괴는 당해 분야의 숙련자에게 공지된 바와 같은 다른 화학적 및 기계적 방법을 사용하여 수행할 수 있다. 예를 들어, 세포 파괴는 알칼리성 가수분해, 비드 분쇄(bead milling), 초음파처리, 세제 가수분해, 용매 추출, 신속한 감압(즉, 세포 밤 방법(cell bomb method), 또는 고-전단 기계적 방법, 화학물질과의 접촉, 균질화, 초음파, 분쇄, 전단력, 프렌치 프레스(French press), 냉간-프레싱(cold-pressing), 가열, 건조, 삼투압 쇼크, 압력 맥동(pressure oscillation), 자기분해의 발현, 또는 이들의 조합을 사용하여 수행할 수 있다.

[0056] 상기 방법은 예비-처리 단계를 추가로 포함할 수 있으며, 여기서 상기 예비-처리 단계는 세포를 상기 접촉 단계 전에 파괴시킴을 포함한다. 예비-처리 단계는 화학적, 기계적, 또는 효소적 세포 파괴 방법을 사용하여 수행할 수 있다. 다시 말해서, 세포 파괴는 본원에 기술된 화학적, 효소적, 및/또는 기계적 방법의 2개 이상의 조합(예를 들어, 비드-분쇄와 조합된 효소적 가수분해)을 사용하여 수행할 수 있다. 세포 파괴 방법은 연속적으로(예를 들어, 비드-분쇄에 이은 효소 가수분해) 수행할 수 있다. 임의로, 화학적 또는 기계적 방법은 제1의 가수분해 단계에 이어 제2의 가수분해 단계로서 효소적 세포 파괴로서 수행될 수 있다. 이들 실시예에서, 단지 하나의 세포 파괴 방법을 수행하는 경우에 사용된 효소의 양과 비교하여 보다 적은 양의 효소가 상기 효소적 파괴 단계에서 사용될 수 있다.

[0057] 농축

[0058] 상기 효소적 가수분해로부터 생성된 파괴된 미생물은 발효 배지로부터 분리하여 제거함으로써 농축시켜 후속적인 단계를 위한 파괴된 미생물의 바람직한 농도를 제공할 수 있다. 임의로, 상기 파괴된 미생물은 원심분리에 이어 하나 이상의 물질을 제거함으로써 농축시켜 바람직한 농도를 제공한다. 원심분리를 사용하는 경우, 임의로, 상기 원심분리는 중층(heavy layer) 및 경층(light layer)을 포함하는 2개 이상의 층을 제공할 수 있다. 중층은 가용성 발효 배지 성분과 물을 포함하며 경층은 지질 및 소비된 바이오매스 형태의 파괴된 미생물을 포함한다. 경층은 또한 일부 물을 포함할 수 있다. 경층은 유액 형태의 지질 및 바이오매스 중의 적어도 일부 및 물을 포함할 수 있다.

[0059] 농축 단계는 접촉 단계에 존재하는 하나 이상의 물질을 제거함을 포함한다. 예를 들어, 농축 단계는 수성 제거를 포함할 수 있다. 임의로, 농축 단계는 포함적으로 약 25 내지 약 95 용적%의 수성 제거(예를 들어, 약 85 용

적%의 수성 제거)를 포함한다. 임의로, 농축 단계는 예를 들어, 증층을 밸브를 통해 배수하거나 증층을 흡입 또는 경사여과함으로써, 증층의 적어도 일부를 제거함을 포함한다.

[0060] 임의로, 상기 농축되고 파괴된 미생물은 하기 기술된 추출 단계에 따라서 파괴된 미생물로부터 오일을 회수하기 전에 일정 기간 동안 정지시킬 수 있다. 농축되고 파괴된 미생물은 24시간 이하(예를 들어, 1시간, 2시간, 5시간, 10시간, 15시간, 20시간, 또는 24시간) 정지시킬 수 있다.

[0061] 추출

[0062] 위에서 기술한 바와 같이, 지질은 염의 존재하에 및 유기 용매의 부재하에 고온에서 파괴된 미생물로부터 추출된다.

[0063] 상기 추출 단계는 고온에서 수행될 수 있다. 본원에 사용된 것으로서, 고온은 적어도 약 55°C(예를 들어, 약 55°C 및 이를 포함하는 온도 내지 약 95°C 및 이를 포함하는 온도)를 말한다. 예를 들어, 지질 및 바이오매스 혼합물을 염, 오일, 또는 생물연료와 약 65°C 이상, 약 70°C 이상, 약 75°C 이상, 약 80°C 이상, 약 85°C 이상, 약 90°C 이상, 또는 약 95°C 이상의 온도에서 접촉시킬 수 있다.

[0064] 상기 추출 단계는 염의 존재하에 수행된다. 염은 예를 들어, 황산나트륨일 수 있다. 상기 추출 단계 동안에 가해진 염의 농도는, 추출 혼합물의 용적을 기준으로 하여, 1 내지 약 5%(v/v) 및 이를 포함하는 농도(예를 들어 약 3%(v/v) 및 이를 포함하는 농도 내지 약 5%(v/v) 및 이를 포함하는 농도일 수 있다). 예를 들어, 상기 추출 단계 동안에 가해진 염의 농도는 약 1%, 약 2%, 약 3%, 약 4%, 또는 약 5%일 수 있다.

[0065] 지질은 유기 용매(예를 들어, C₅-C₁₂ 알칸, 염소화된 C₁-C₆ 알칸, C₁-C₆ 알코올, 또는 초임계 이산화탄소)의 부재하에 파괴된 미생물로부터 추출된다. 본원에 사용된 것으로서, "유기 용매의 부재하에"는 파괴된 미생물의 중량을 기준으로 하여 약 0.5% 미만(예를 들어, 약 0.4% 미만, 약 0.3% 미만, 약 0.2% 미만, 약 0.1% 미만, 약 0.05% 미만, 약 0.01% 미만, 약 0.005% 미만, 또는 0%)의 용매를 의미한다.

[0066] 임의로, 지질은 오일(예를 들어, 코코넛 오일) 또는 생물연료를 가함으로써 상기 파괴된 미생물로부터 추출될 수 있다.

[0067] 임의로, 상기 추출 단계 동안에 첨가된 오일은 영양 오일(예를 들어, 영양원으로부터 기원하거나 수득된 오일)일 수 있다. 본원에 기술된 방법에서 사용하기 위한 적합한 영양 오일의 예는 코코넛 오일, 팜 오일, 캐놀라 오일, 해바라기 오일, 대두 오일, 옥수수 오일, 올리브 오일, 잇꽃 오일, 팜 커널 오일, 면화씨 오일, 및 이의 조합물을 포함한다. 알킬화된 유도체와 같은 이들 오일 중 어느 것의 유도체(예를 들어, 메틸화되거나 에틸화된 오일)가 또한 사용될 수 있었다.

[0068] 본원에 사용된 것으로서, 생물연료는 바이오매스 출발 물질로부터 유도된 어떠한 연료, 연료 첨가물, 방향족, 및/또는 지방족 화합물을 말한다. 예를 들어, 본원에 기술된 방법에서 사용하기에 적합한 생물연료는 식물원 또는 조류원으로부터 유도될 수 있다. 생물연료용으로 적합한 공급원의 예는 조류, 옥수수, 스위치그래스 (switchgrass), 사탕수수, 사탕무우, 평지씨, 대두 등을 포함한다.

[0069] 임의로, 생물연료는 생물학적 공급원으로부터의 오일을 수거하여 상기 오일을 생물연료로 전환시킴으로써 수득할 수 있다. 생물학적 공급원으로부터 수득된 오일(예를 들어, 식물 및/또는 조류 공급원으로부터 수득된 오일)을 전환하는 방법은 당해 분야의 숙련자에게 공지되어 있다. 임의로, 생물연료를 수득하는 방법은 오일을 생산하는 생물연료(예를 들어, 조류)를 배양하는 단계, 상기 오일(예를 들어, 조류 오일)을 추출하는 단계, 및 상기 오일(예를 들어, 조류 오일)을 전환시켜 생물연료를 형성시키는 단계를 포함할 수 있다. 임의로, 상기 오일은 에스테르교환반응을 사용하여 생물연료로 전환시킬 수 있다. 본원에 사용된 것으로서, 에스테르교환반응은 에스테르의 알콕시 기를 다른 알코올로 교환하는 공정을 말한다. 예를 들어, 본원에 기술된 방법에서 사용하기 위한 에스테르교환반응 공정은 조류, 예를 들어, 트리글리세라이드를 생물디젤, 예를 들어, 지방산 알킬 에스테르 및 글리세롤로 전환시킴을 포함할 수 있다. 에스테르교환반응은 산 또는 염기 촉매된 반응과 같은 전통적인 화학적 공정을 사용하거나, 효소-촉매된 반응을 사용함으로써 달성할 수 있다.

[0070] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "유기 용매"는, 당해 용어가 본원에서 정의되며, 코코넛 오일, 팜 오일, 캐놀라 오일, 해바라기 오일, 대두 오일, 옥수수 오일, 올리브 오일, 잇꽃 오일, 팜 커널 오일, 면화씨 오일 또는 이의 알킬화된(예를 들어, 메틸화되거나 에틸화된) 유도체와 같은 영양 오일을 포함하지 않으므로, 생물연료를 포함하지 않는다.

- [0071] 임의로, 파괴된 미생물로부터 지질을 추출하는데 사용된 오일 또는 생물연료는 추출된 지질로부터 후속적으로 제거되지 않는다. 추출된 오일의 후속된 분획화(여기서, 첨가된 오일 또는 생물연료는 단지 하나의 오일 분획과 함께 머문다)는 추출된 지질로부터의 오일 또는 생물연료의 제거를 고려하지 않는다. 예를 들어, 회수 후 본원에 기술된 오일은 본원에 기술된 하나 이상의 생성물로서 사용하기 위해 다른 오일과 합해지거나, 하나 이상의 생성물 내로 포함될 수 있다. 생물연료와 같은, 다른 오일 또는 생성물 중의 어느 하나도 회수 공정의 종결 후에 회수된 오일과 합하는 것에 대한 대안으로서, 또는 이와 합하는 것 외에, 추출 단계 동안에 지질 및 바이오매스의 혼합물에 첨가될 수 있다. 추출 단계 동안 다른 오일의 첨가는 소비된 바이오매스로부터 지질의 탈유화(demulsification) 및 분리를 보조할 수 있다.
- [0072] 바이오매스로부터 지질을 분리하기 위한 유기 용매 추출에 의존하는 전통적인 방법에서, 유기 용매는, 비록 전형적으로 미량의 용매가 남아있다고 하더라도, 회수 후 지질로부터 제거되어야만 한다. 그러나, 본원에 기술된 방법에서, 임의로 추출 단계 동안에 첨가된 오일 또는 생물연료 중 약 80% 이상은, 이것이 최종 생성물로서 사용되거나 이에 포함되는 경우 회수된 오일 속에 잔존한다. 즉, 임의로 추출 단계 동안 첨가된 오일 또는 생물연료의 약 20% 미만은 최종 생성물로서 사용되기 전에 또는 이에 포함되기 전에 회수된 오일로부터 제거된다. 예를 들어, 임의로 추출 단계 동안 첨가된 오일 또는 생물연료의 약 15% 미만, 약 10% 미만, 약 5% 미만, 약 2% 미만, 또는 0%가 이의 사용 전, 또는 최종 생성물내로 포함되기 전에 회수된 오일로부터 제거된다.
- [0073] 파괴된 미생물 또는 바이오매스는 상기 미생물 또는 바이오매스로부터 지질을 추출하기에 적합한 기간 동안 염, 오일, 및/또는 생물연료와 혼합할 수 있다. 예를 들어, 염, 오일, 및/또는 생물연료 및 파괴된 미생물 또는 바이오매스는 약 10분 이상, 20분 이상, 30분 이상, 40분 이상, 50분 이상, 1시간 이상, 또는 2시간 이상 동안 혼합할 수 있다. 후속적으로, 상기 지질은 용액을 원심분리함으로써 상기 혼합물의 나머지 성분으로부터 분리할 수 있다.
- [0074] 임의로, 미생물에 의해 이론적으로 생산된 지질의 적어도 65%는 당해 방법(즉, 상기 방법은 적어도 약 65% 수율을 제공한다)을 사용하여 상기 파괴된 미생물로부터 추출된다. 예를 들어, 상기 파괴된 미생물의 집단으로부터 추출된 지질의 수율은 적어도 약 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 또는 적어도 85%일 수 있다.
- [0075] 대안적으로, 상기 추출 단계는 오일 또는 생물연료의 부재하에 수행될 수 있다. 예를 들어, 상기 지질은 기계적 방법을 사용하여 추출할 수 있다. 가수분해된 바이오매스 및 미생물은 농축시킬 수 있고 지질은 성분의 나머지에서 분리할 수 있다. 원심 분리에 의하여 오일을 분리하는 것은 임의로 바이오매스 유액에 황산나트륨을 첨가하는 단계를 포함할 수 있다. 임의로, 원심분리는 본원에서 기술된 바와 같이 고온(예를 들어, 약 55°C 이상, 예컨대 약 80°C)에서 수행될 수 있다. 임의로, 상기 지질은 원심분리된 물질의 상부 층 속에 함유되며, 예를 들어, 다른 물질로부터 흡입 또는 경사분리에 의해 제거될 수 있다.
- [0076] 임의로, 미생물에 의해 생산된 지질의 적어도 65%는 당해 방법(즉, 상기 방법은 적어도 약 65% 수율을 제공한다)을 사용하여 상기 파괴된 미생물로부터 추출된다. 예를 들어, 상기 파괴된 미생물의 집단으로부터 추출된 지질의 수율은 생산된 총량의 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 또는 적어도 90%일 수 있다.
- [0077] **III. 생성물**
- [0078] 본원에 기술된 방법에 따라 생산된 다중불포화된 지방산(PUFA)(예를 들어, DHA, EPA) 및 다른 지질은 예를 들어, 이들의 생물학적 또는 영양학적 특성을 이용하는, 다양한 적용 중 어느 것에서도 이용될 수 있다. 임의로, 화합물은 약제, 영양 오일(예를 들어, 영양 오일 보충물), 식품 보충물, 동물 사료 첨가물, 화장품, 생물 연료 등에서 사용될 수 있다. 본원에 기술된 방법에 따라 생산된 지질은 또한 다른 화합물의 생산시 중간체로서 사용될 수 있다. 임의로, 본원에 기술된 방법에 따라 생산된 지질은 최종 생성물(예를 들어, 음식 또는 사료 보충물, 유아식, 약제, 연료(예컨대, 생물연료) 등)에 포함시킬 수 있다.
- [0079] 본원에 기술된 지질을 포함시키기에는 적합한 식품 또는 사료 보충물은 우유, 물, 스포츠 음료, 에너지 음료, 차, 및 주스와 같은 음료; 젤리 및 비스킷과 같은 당과제품; 유제품과 같은 지방-함유 식품 및 음료; 연질미(또는 오토밀)와 같은 가공된 식료품; 이유식; 아침식사용 시리얼 등내로 포함될 수 있다. 임의로, 한 가지 이상 생산된 지질은, 예를 들어, 멀티비타민과 같은 식이 보충물 속에 포함될 수 있다. 임의로, 본원에 기술된 방법에 따라 생산된 지질은 식이 보충물 속에 포함될 수 있으며 임의로 식품 또는 사료(예를 들어, 식품 보충물)의 성분 내로 직접 포함될 수 있다.
- [0080] 본원에 기술된 방법에 의해 생산된 지질이 포함될 수 있는 사료의 예는 고양이 사료; 개 사료 등과 같은 애완동물 사료; 관상어 또는 갑각류 등을 위한 사료; 농장에서 키운 동물을 위한 사료(예를 들어, 가축 및 수산증식에

서 생성된 어류 또는 갑각류 포함)를 포함한다. 본원에 기술된 방법에 따라 생산된 지질이 포함될 수 있는 식품 또는 사료는 바람직하게는 의도된 수용체인 유기체의 구미에 맞을 수 있다. 당해 식품 또는 사료 물질은 식품 재료에 대해 현재 공지된 어떠한 물리적 특성(예를 들어, 고체, 액체, 연질)을 가질 수 있다.

[0081] 임의로, 생산된 화합물(예를 들어, PUFA) 중의 하나 이상이 약제대로 포함될 수 있다. 이러한 약제의 예는 다양한 유형의 정제, 캡슐제, 마실 수 있는 제제 등을 포함한다. 임의로, 약제는 국소 적용에 적합하다. 용량형은 예를 들어, 캡슐제, 오일, 과립제, 과립 섭틸(*granula subtilae*), 풀버(*pulver*), 정제(*tabellae*), 환제, 트로키제 등을 포함할 수 있다.

[0082] 임의로, 생산된 화합물 중의 하나 이상이 생물연료 내로 포함될 수 있다. 예를 들어, 생물연료는 하나 이상의 생산된 화합물의 에스테르교환반응에 의하여 생산될 수 있다. 생물연료는 생산된 오일의 염기 촉매된 에스테르 교환반응, 오일의 산 촉매된 에스테르교환반응, 또는 오일의 이의 지방산으로의, 이후 생물연료로의 전환에 의하여 생산될 수 있다.

[0083] 본원에 기술된 방법에 따라 생산된 지질은 다양한 제제 중의 어느 것을 조합함으로써 본원에 기술된 바와 같은 생성물 내로 포함될 수 있다. 예를 들어, 이러한 화합물은 하나 이상의 결합제 또는 충전제와 혼합될 수 있다. 일부 구현예에서, 생성물은 하나 이상의 킬레이트제, 안료, 염, 계면활성제, 습윤화제, 점도 조절제, 증점제, 연화제, 향료, 방부제 등, 및 이의 조합물을 포함할 수 있다.

[0084] 하기 예들은 본원에 기술된 방법 및 조성물의 특정 국면을 추가로 예증하기 위한 의도이며, 청구범위의 영역을 한정하는 것으로 의도되지 않는다.

[0085] **실시예**

[0086] **실시예 1. 저온살균, 수거 및 세척, 및 화학적 가수분해**

[0087] *저온살균*

[0088] T18 바이오매스를 60°C에서 1시간 동안 교반하면서 가열함으로써 세포를 저온살균시켰다.

[0089] *수거 및 세척*

[0090] 저온살균된 T18 바이오매스를 4150rpm에서 20분 동안 주위 온도에서 원심분리하여 세포 페이스트로부터 최종 배지를 분리하였다. 배지를 제거하고, 등가 질량의 물을 세포 페이스트에 가하여 세포를 세척하였다. 세포 페이스트-물 혼합물을 1분 동안 진탕시키고, 재-원심분리하고, 수성 상을 제거하였다.

[0091] *화학적 가수분해*

[0092] 물로 세척한 T18 세포 페이스트를 물을 사용하여 150g/L로 조절하였다. 소샘플(subsample; 10mL)을 제거하고 50mL 원심분리 튜브에 가하였다. 각각의 소샘플을 표 1에 따른 최종 농도로 산 또는 염기를 사용하여 처리하였다. 혼합물을 121°C에서 15분 동안 오토클레이빙(*autoclaving*)하여 세포를 가수분해하였다. 가수분해 후 샘플을 헥산-추출하여 질량 균형에 의해 회수된 오일의 퍼센트를 측정하였다(도 1). 160mM HCl 및 H₂SO₄를 사용한 가수분해로 85%의 오일 회수물을 생성하였다.

표 1

[0093]

샘플 번호	산 / 염기 유형	농도(mM)	오일 회수율(%)
1	HCl	40	1
2	HCl	100	47
3	HCl	160	100
4	H ₃ PO ₄	40	12
5	H ₃ PO ₄	100	3
6	H ₃ PO ₄	160	5
7	H ₂ SO ₄	40	7
8	H ₂ SO ₄	100	68
9	H ₂ SO ₄	160	94
10	NaOH	40	8

11	NaOH	100	40
12	NaOH	160	52
13	KOH	40	8
14	KOH	100	20
15	KOH	160	54

[0094] 실시예 2. 효소적 가수분해

[0095] 물로 세척된 T18 세포 페이스트를 물을 사용하여 220g/L로 조절하였다. pH를 1N NaOH를 사용하여 7.5로 조절하였다. 소샘플(10mL)을 제거하고 50mL 원심분리 튜브에 가하였다. 각각의 소샘플을 표 2에 따른 효소로 처리하였다. 상기 혼합물을 50℃에서 22시간 동안 진탕시키면서 항온처리하여 세포를 가수분해하였다. 가수분해 후, 샘플을 헥산-추출하여 질량 균형으로부터 회수된 오일의 퍼센트를 측정하였다(도 2). 알칼라제 단독 또는 다른 효소와의 조합물을 사용한 가수분해로 85%를 초과하는 오일 회수율을 획득하였다.

표 2

[0096]

샘플 번호	효소	농도(% v/v)	오일 회수율(%)
1	비스코자임	0.2	0.1
2		0.4	0.3
3	알칼라제	0.2	96
4		0.4	96
5	플라보르자임	0.2	1
6		0.4	0.3
7	만나웨이	0.2	0
8		0.4	0.8
9	알칼라제/비스코자임	0.2/0.2	93
10	알칼라제/만나웨이	0.2/0.2	91
11	플라보자임/만나웨이	0.2/0.2	0.3

[0097] 실시예 3. 산 및 효소적 가수분해, 세척의 효과

[0098] 저온살균되고, 세척되지 않은 T18 바이오매스(10mL)의 소샘플을 50mL 원심분리 튜브에 가하였다. 대조군을 물-세척하고, 170g/L 물로 조절하고, 50mL 원심분리 튜브내로 소샘플링하였다. 각각의 소샘플을 산 또는 효소로 표 3에 따라 처리하였다. 산 가수분해된 샘플을 121℃에서 15분 동안 오토클레이빙하여 세포를 가수분해하였다. 효소적으로 가수분해된 샘플을 1N NaOH를 사용하여 pH 7.5로 조절하고 50℃에서 26시간 동안 진탕하면서 항온처리하여 세포를 가수분해하였다. 산 또는 효소적 가수분해 후, 샘플을 헥산-추출하여 질량 균형에 의해 회수된 오일의 퍼센트를 측정하였다(도 3). 세척된 오일 회수율과 등가인 세척되지 않은 오일 회수율은 0.2% 알칼라제 가수분해로 달성되었다.

표 3

[0099]

샘플 번호	세척됨/ 세척되지 않음	산/효소 처리	농도	회수된 오일(%)
1	세척되지 않음	H ₂ SO ₄	40 mM	5
2	세척됨	H ₂ SO ₄	40 mM	61
3	세척되지 않음	H ₂ SO ₄	160 mM	27
4	세척됨	H ₂ SO ₄	160 mM	91
5	세척되지 않음	알칼라제	0.2% v/v	93
6	세척됨	알칼라제	0.2% v/v	94

[0100] 실시예 4. 효소적 가수분해, 온도/시간의 효과

[0101] 물-세척된 T18 세포 페이스트를 물을 사용하여 210g/L로 조절하였다. pH를 1N NaOH를 사용하여 7.5로 조절하였다. 소샘플(10mL)을 50mL의 원심분리 튜브내로 가하였다. 각각의 소샘플을 0.2% v/v 알칼라제로 처리하였다. 상기 혼합물을 70℃에서 4시간 동안 진탕하면서 항온처리하여 세포를 가수분해하였다. 대조군은 55℃에서 18시간 동안 진탕하면서 항온처리하였다. 가수분해 후, 샘플을 헥산-추출하여 질량 균형에 의해 회수된 오일의 퍼센트를 측정하였다(도 4). 상기 온도를 70℃로 상승시킴으로써, 55℃에서 18시간 동안 가수분해한 것에 대해 증가인 오일 회수율이 4시간내에 달성되었다.

[0102] 실시예 5. 효소적 가수분해, 생물연료로 추출

[0103] 물-세척된 T18 세포 페이스트를 물을 사용하여 200g/L로 조절하고, pH를 1N NaOH를 사용하여 7.5로 조절하였다. 소샘플(10mL)을 제거하고 50mL 원심분리 튜브에 가하였다. 각각의 소샘플을 0.2% v/v 알칼라제로 처리하였다. 상기 혼합물을 55℃에서 18시간 동안 진탕하면서 항온처리하여 세포를 가수분해하였다. 가수분해 후, 각각의 소샘플을 표 4에 따라 생물연료로 추출하고 오일의 퍼센트를 질량 균형에 의해 및 순수한 오일의 지질 부류 프로파일을 기준으로 측정하였다(도 5 및 표 4). 1:0.4(습윤 바이오매스:생물연료)를 사용한 추출로 지질 부류 프로파일을 기준으로 하여 85% 이상의 오일 회수율을 생성하였다. 트리글리세라이드(TG) 조류 오일을 에틸화(EE)하고 오일 추출 뿐만 아니라 모 TG 오일을 위해 사용하였다(표 5). 습윤 바이오매스:EE 조류 오일의 모든 비는 지질 부류 프로파일을 기준으로 하여 85%를 초과하는 오일 회수율을 생성하였다.

표 4

[0104]

습윤 바이오매스:생물연료비	TG:EE-FFA 비	조류 오일%	실제 조류 오일%	회수된 오일(%)
순수한 조류 오일	52.8	100		
1:2	0.0455	4.45	7.96	56
1:1	0.0764	7.44	14.7	51
1:0.4	0.268	20.48	23.5	96
1:0.2	0.42	31.42	46.4	68
생물연료	0.00291	0		

표 5

[0105]

습윤 바이오매스:추출 오일 비	오일 추출 효능(질량 균형 기준)(%)	오일 추출 효능(DHA:올레산 비)(%)
생물연료		
1:2	76	56
1:1	54	51
1:0.4	59	96
1:0.2	54	68
TG 조류 오일		
1:2	52	
1:1	40	
1:0.4	34	
1:0.2	43	
EE 조류 오일		
1:2	76	100
1:1	70	100
1:0.4	75	100
1:0.2	83	100

[0106] 실시예 6. 효소적 가수분해, 무용매 오일 추출

[0107] 224g/L의 고체 농도(159g/L 바이오매스 농도)에서 200mL의 세척되지 않은 T18 바이오매스를 55℃로 가열하고 1N NaOH를 사용하여 pH 8로 조절하였다. 샘플을 0.4%(v/v) 알칼라제로 처리하고 55℃에서 18시간 동안 진탕시켜 항온처리함으로써 세포를 가수분해하였다. 가수분해 후 샘플을 4600rpm에서 20분 동안 40℃에서 원심분리하여 농축되고 가수분해된 바이오매스로부터 배지를 분리하였다. 85%의 배지가 제거되었다. 수성 제거 후, 나머지 샘플

을 4600rpm에서 20분 동안 40℃에서 원심분리하여 소비된 바이오매스로부터 오일을 분리하였다. 오일을 회수하고 회수된 오일 %를 질량 균형(mass balance)으로 측정하였다. 가수분해 후 수성 농축물을 감소시킴으로써, 90%를 초과하는 오일 회수율이 무용매 오일 추출에 의해 달성되었다.

[0108] **실시예 7. 대규모의, 무용매 오일 추출**

[0109] 111g/L 바이오매스 농도에서 151,400kg의 세척되지 않은 T18 바이오매스를 55℃로 가열하고 50N NaOH를 사용하여 pH 8로 조절하였다. 606L의 알칼라제를 가하고, pH를 다시 8로 조절하고, 혼합물을 2개의 용기를 사이에서 재순환시켜 55℃에서 18시간 동안 가수분해를 위해 혼합하였다. 가수분해 후, 브로쓰(broth)의 중량은 160,400kg이었다. 가수분해된 바이오매스를 원심분리를 위해 55℃에서 유지시켜 농축되고 가수분해된 바이오매스로부터 배지를 분리하였다(도 6). 134,400kg의 배지를 제거하고 26,000kg의 농축되고 가수분해된 바이오매스를 회수하였다. 농축되고 가수분해된 바이오매스를 1300kg의 Na₂SO₄로 처리하고 원심분리 전에 90℃에서 혼합하면서 가열하여 소비된 바이오매스로부터 오일을 분리하였다(도 7). 7606kg의 오일을 82%의 총 오일 회수율을 위해 회수하였다. 회수된 오일의 과산화물 가(peroxide value: PV) 및 산 가(acid value: AV)는 각각 0.4meq/kg 및 0.38mg KOH/g이었다.

[0110] **실시예 8. 최적화된 효소 농도/시간(0.1% 효소)**

[0111] 143g/L 바이오매스 농도에서 세척되지 않은 T18 바이오매스 샘플을 55℃로 가열하고 1N NaOH를 사용하여 pH 8.0으로 조절하였다. 25mL의 소샘플을 50mL의 원심분리 튜브로부터 제거하였다. 각각의 소샘플을 표 6에 따라 처리하였다. 혼합물을 55℃에서 진탕하면서 항온처리하여 세포를 가수분해하였다. 가수분해 후 샘플을 100℃ 욕에 20분 동안 두어 효소를 불활성화시켰다. 효소 불활성화 후, 샘플을 40℃에서 4600rpm에서 20분 동안 두어 배지가 농축되고 가수분해된 바이오매스로부터 분리되도록 하였다. 약 80%의 배지를 제거하였다. 배지를 0.25 μm 여과기를 통과시키고 가수분해도를 o-프탈디알데하이드(OPA) 방법에 의해 측정하였다(참고: Spellman, D., McEvoy, E., O'Cuinn, G., and Fitz, G.R.J. 2003. Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis. *International Dairy Journal*, 13: 447-453). 표 6을 참고한다.

[0112] 농축되고 가수분해된 바이오매스를 5%(w/v) Na₂SO₄로 처리하고 70℃에서 60분 동안 진탕시키면서 가열하였다. 처리 후, 샘플을 40℃에서 4600rpm으로 20분 동안 원심분리하여 소비된 바이오매스로부터 오일을 분리하였다. 오일을 회수하고 회수된 오일%를 질량 균형으로 측정하였다(도 8). 0.1% 알칼라제를 사용한 가수분해는 4시간 후에 완료하였다.

표 6

[0113]

샘플 번호	효소 농도(% v/v)	가수분해 시간(h)	오일 회수율(%)	아미노산 농도(mM)
1	0	0	<5%	26.4
2	0.1	0	82.6	38.2
3	0	2	<5%	24.3
4	0.1	2	83.9	41.5
5	0	4	<5%	22.6
6	0.1	4	86.1	46.3
7	0	6	<5%	23.6
8	0.1	6	85.9	47.5
9	0	24	<5%	23.5
10	0.1	24	89.1	51.5

[0114] **실시예 9: 최적화된 효소 농도/시간(0.05% 효소)**

[0115] 143g/L 바이오매스 농도에서 세척되지 않은 T18 바이오매스 샘플을 55℃로 가열하고 1N NaOH를 사용하여 pH 8.0으로 조절하였다. 25mL의 소샘플을 50mL 원심분리 튜브내로 제거하였다. 각각의 소샘플을 표 7에 따라 처리하였다. 혼합물을 55℃에서 진탕하면서 항온처리하여 세포를 가수분해하였다. 가수분해 후 샘플을 100℃ 욕에 20분 동안 두어 효소를 불활성화시켰다. 효소 불활성화 후 샘플을 4600rpm에서 20분 동안 40℃에서 원심분리시켜 농축되고 가수분해된 바이오매스로부터 배지를 분리하였다. 약 80%의 배지를 제거하였다. 배지를 0.25 μm 여과기에 통과시키고 가수분해도를 OPA 방법으로 측정하였다(표 7).

[0116] 농축되고 가수분해된 바이오매스를 5%(w/v) Na₂SO₄로 처리하고 70℃에서 60분 동안 진탕시키면서 가열하였다. 처리 후, 샘플을 40℃에서 4600rpm으로 20분 동안 원심분리하여 소비된 바이오매스로부터 오일을 분리하였다. 오일을 회수하고 회수된 오일의 %를 질량 균형으로 측정하였다(도 9). 0.05% 알칼라제를 사용한 가수분해는 6시간 후 완료하였다.

표 7

샘플 번호	효소 농도(% v/v)	가수분해 시간(h)	오일 회수율(%)	아미노산 농도(mM)
1	0	0	<5%	45.2
2	0.05	0	69.7	49.0
3	0	2	<5%	41.7
4	0.05	2	85.7	52.6
5	0	4	<5%	42.8
6	0.05	4	82.5	55.6
7	0	6	<5%	43.1
8	0.05	6	79.1	56.9
9	0	24	<5%	39.9
10	0.05	24	86.2	53.9

[0118] 실시예 10. 효소적 가수분해, 저 pH

[0119] 세척되지 않은 T18의 150mL의 소샘플을 250mL의 비이커내로 제거하였다. 각각의 소샘플을 1M HCl 또는 NaOH로 처리하여 표 8에 따른 바람직한 pH로 조절하였다. 각각의 pH 조건의 30mL의 소샘플을 50mL의 원심분리 튜브내로 제거하였다. 각각의 소샘플을 0.5%(v/v) 알칼라제로 처리하였다. 혼합물을 55℃에서 16시간 동안 진탕시키면서 항온처리하여 세포를 가수분해하였다. 가수분해 후 샘플을 40℃에서 4600rpm으로 20분 동안 원심분리하여 농축되고 가수분해된 바이오매스로부터 배지를 분리하였다. 약 60% 배지를 제거하였다. 농축되고 가수분해된 바이오매스를 5%(w/v) Na₂SO₄로 처리하고 70℃에서 60분 동안 진탕시키면서 가열하여 소비된 바이오매스로부터 오일을 분리하였다. 오일을 회수하고 무용매적으로 회수된 오일%를 질량 균형으로 측정하였다(도 10). 등량의 오일 회수가 pH 5.5 및 8에서 달성되었다.

표 8

샘플 번호	가수분해용 pH	오일 회수율(%)
1	8	66.9±2.3
2	3.5	0
3	4.5	0
4	5.5	60.3±5.9
5	6.5	70.4±1.0
6	7.5	71.0±5.6

[0121] 실시예 11. 효소적 가수분해, 대체 효소

[0122] 세척되지 않은 T18 바이오매스 중 30mL의 소샘플을 50mL의 원심분리 튜브내로 제거하였다. 각각의 소샘플을 표 9에 따라 0.5%(v/v) 효소로 처리하였다. 혼합물을 55℃에서 진탕하면서 항온처리하여 세포를 가수분해하였다. 가수분해 후 샘플을 40℃에서 4600rpm으로 20분 동안 원심분리하여 농축되고 가수분해된 바이오매스로부터 배지를 분리하였다. 약 50% 배지를 제거하였다. 농축되고 가수분해된 바이오매스를 5%(w/v) Na₂SO₄로 처리하고 70℃에서 60분 동안 진탕시키면서 가열하였다. 처리 후, 샘플을 핵산 추출하여 질량 균형에 의해 회수된 오일%를 측정하였다. 대체 효소가 가수분해용 알칼라제만큼 효율적인 것으로 확인되지 않았지만, 선택된 효소들(프로테아제 'M', 사비나제 울트라(Savinase Ultra), 블라제 에비티(Blaze Evity), 또는 폴라르자임(Polarzyme))을 필요할 경우 알칼라제 대신 사용할 수 있었다.

표 9

[0123]

샘플 번호	바이오매스 농도(g/L)	효소	pH	오일 회수율(%)
1	171	알칼라제	8	89
2	171	프로테아제 'M'	6	64
3	171	셀룰라제 'A'	4.5	6.7
4	171	헤미셀룰라제 90	4.5	6.1
5	171	프로테아제/셀룰로즈/헤미셀룰로즈	5	28
6	171	프로테아제/셀룰로즈	5	12
7	171	프로테아제/헤미셀룰로즈	5	20
8	171	셀룰로즈/헤미셀룰로즈	4.5	5.0
9	138	알칼라제	8	98
10	138	사비나제 울트라	8	94
11	138	블라제 에비터	8	93
12	138	뉴트라제	8	7.2
13	150	알칼라제	8	92
14	150	플라르자임	8	88

[0124]

실시예 12. 기계적 가수분해

[0125]

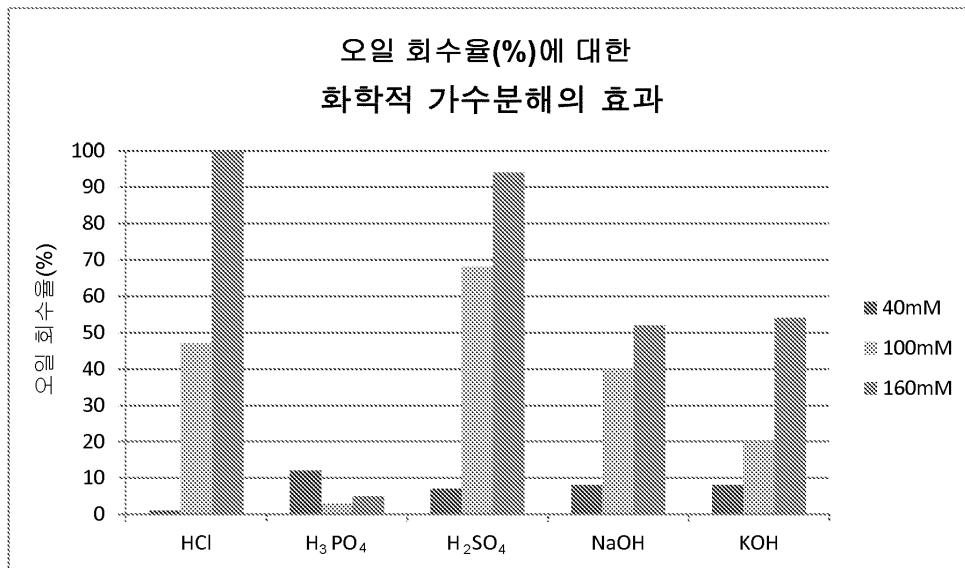
180 g/L 바이오매스 농도에서 세척되지 않은 T18 바이오매스 샘플을 0.6 내지 0.8mm의 산화지르코늄 분쇄 매질 (80%(v/v) 비드 용적)이 로딩(loading)된 300mL의 다이노-밀 멀티 랩 스테인레스 강 챔버(Dyno-Mill Multi Lab stainless steel chamber)내로 공급하였다. 연속 방식으로, 비드 분쇄기를 10m/s의 임펠러 팁 속도(impeller tip speed) 및 80mL/분의 공급 유동 속도에서 작동시켰다. 부분적으로 파괴된 바이오매스 슬러리의 소샘플을 제 2 통과를 위해 파괴하는 챔버를 통해 다시 통과시켰다. 바이오매스 슬러리를 40°C에서 4600rpm으로 20분 동안 원심분리하여 소비된 바이오매스로부터 오일을 분리하였다. 오일을 회수하고 회수된 오일 %를 질량 균형으로 측정하였다. 1 및 2회 통과로 70%의 오일 회수율이 생성되었다.

[0126]

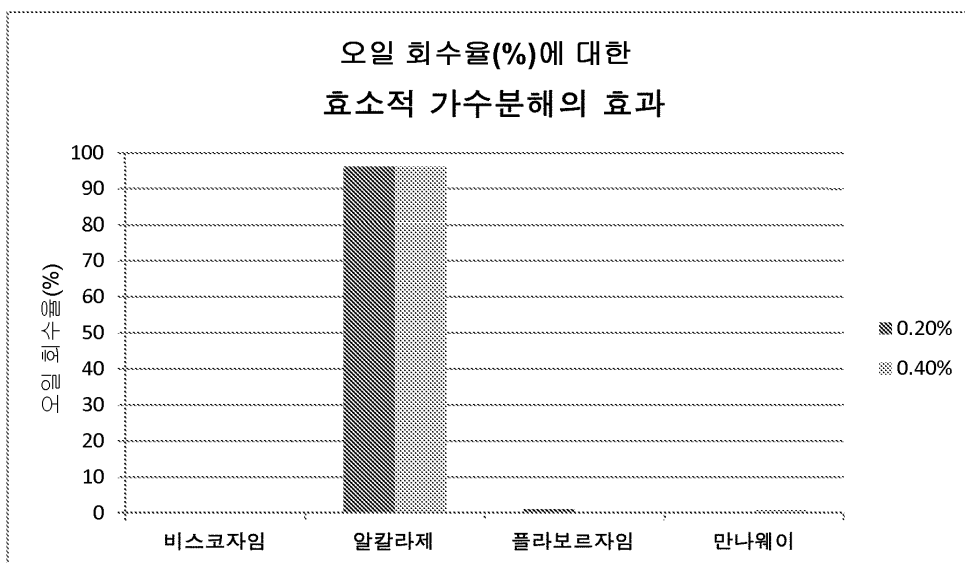
첨부된 청구범위의 조성물 및 방법은 본원에 기술된 구체적인 조성물 및 방법에 의해 범위를 한정하지 않으며, 이는 청구범위의 약간의 국면 및 본 기재내용의 범위내에 있는 기능적으로 등가인 임의의 조성물 및 방법을 예증하는 것으로 의도된다. 본원에 나타내고 기술된 것 이외의 조성물 및 방법의 다양한 변형이 첨부된 청구범위의 범위내에 속하는 것으로 의도된다. 또한, 어떠한 대표적인 조성물, 방법, 및 이들 조성물 및 방법의 국면이 구체적으로 기술되어 있다고 해도, 다른 조성물 및 방법, 및 상기 조성물 및 방법의 다양한 특징의 조합(구체적으로 언급되어 있지 않다고 해도)이 첨부된 청구범위의 범위내에 속하는 것으로 의도된다. 따라서, 단계, 요소, 성분, 또는 구성의 조합은 본원에 명쾌하게 언급될 수 있지만; 단계, 요소, 성분, 및 구성의 모든 다른 조합도 명쾌하게 기술되어 있지 않다고 해도 본원에 포함된다.

도면

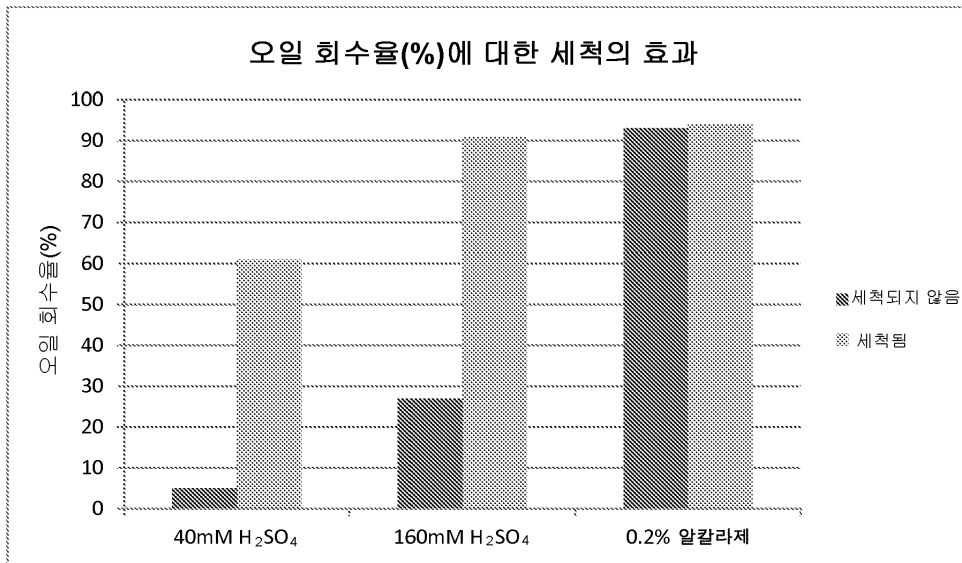
도면1



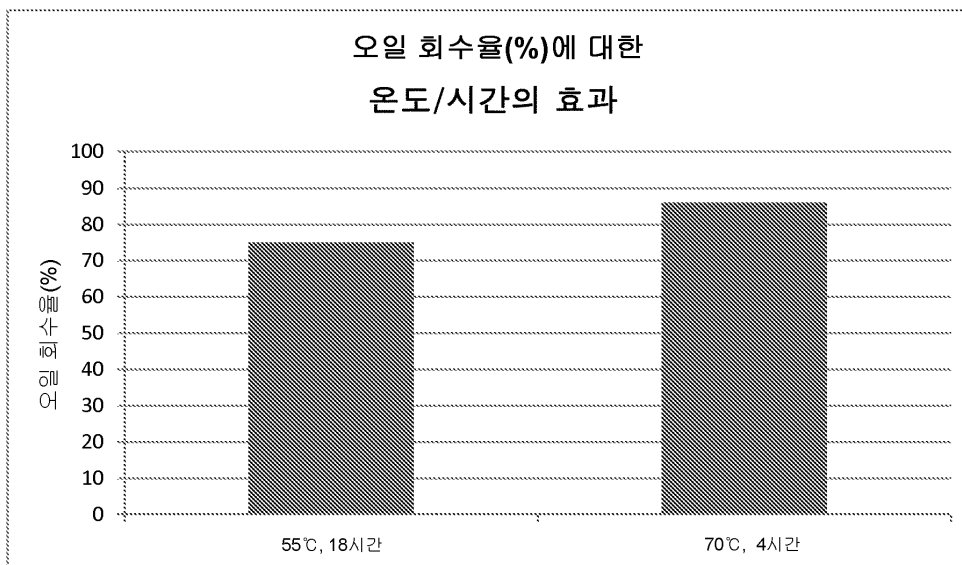
도면2



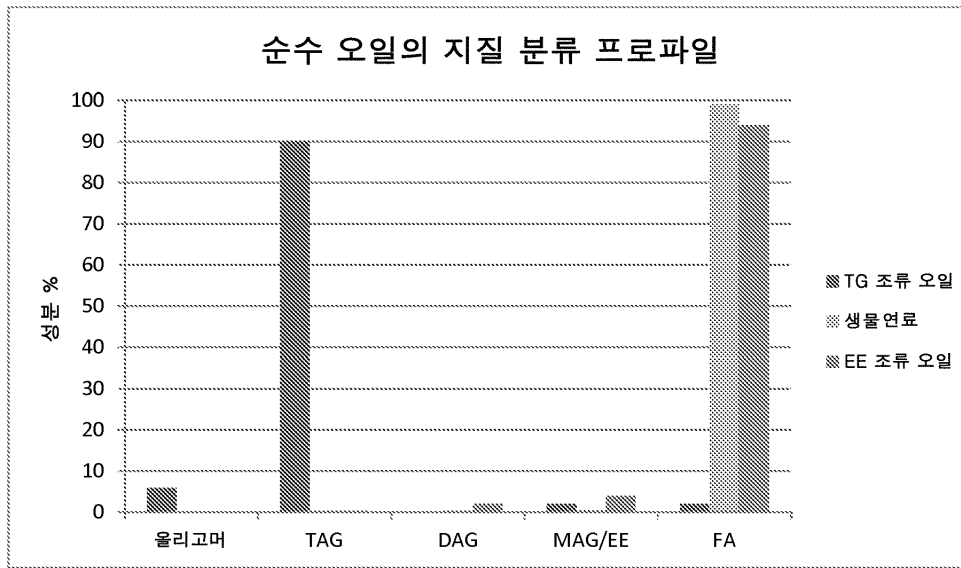
도면3



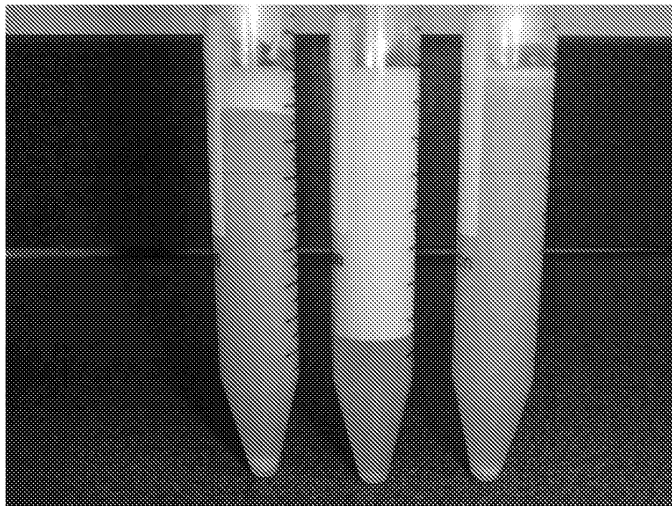
도면4



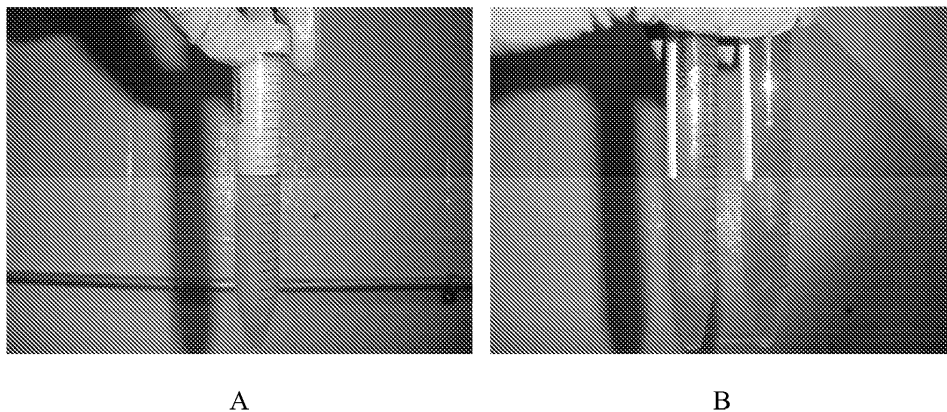
도면5



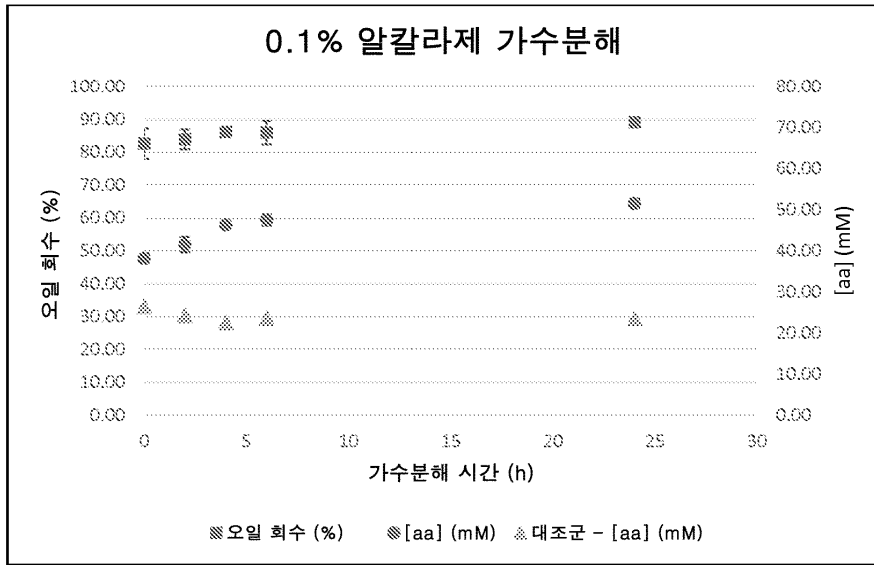
도면6



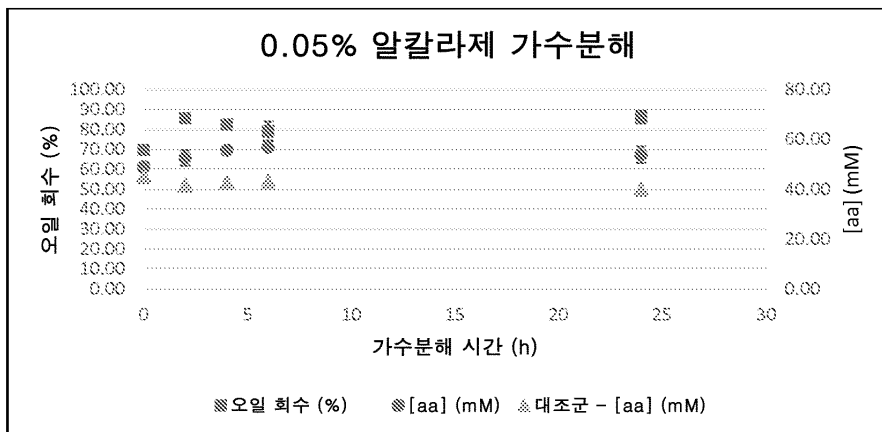
도면7



도면8



도면9



도면10

