(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년02월18일
(11) 등록번호 10-1591834
(24) 등록일자 2016년01월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 7/64 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-7036492(분할)
(22) 출원일자(국제) 2001년01월19일
심사청구일자 2015년01월12일
(85) 번역문제출일자 2014년12월26일
(65) 공개번호 10-2015-0020609
(43) 공개일자 2015년02월26일
(62) 원출원 특허 10-2014-7014820
원출원일자(국제) 2001년01월19일
심사청구일자 2014년06월02일
(86) 국제출원번호 PCT/US2001/001806
(87) 국제공개번호 WO 2001/53512
국제공개일자 2001년07월26일
(30) 우선권주장
60/177,125 2000년01월19일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
US04720456 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
마텍 바이오싸이언스스 코포레이션
미합중국 메릴랜드 21045 콜롬비아 도빈로드 6480
(72) 발명자
뤼커,크래이그 엠.
미합중국 캘리포니아주 92129 샌디에고 피필로 스트리트 9238
아두-페사,스위딘 패트릭
미합중국 캘리포니아주 92131 샌디에고 록스보로 로드 11097
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이종우

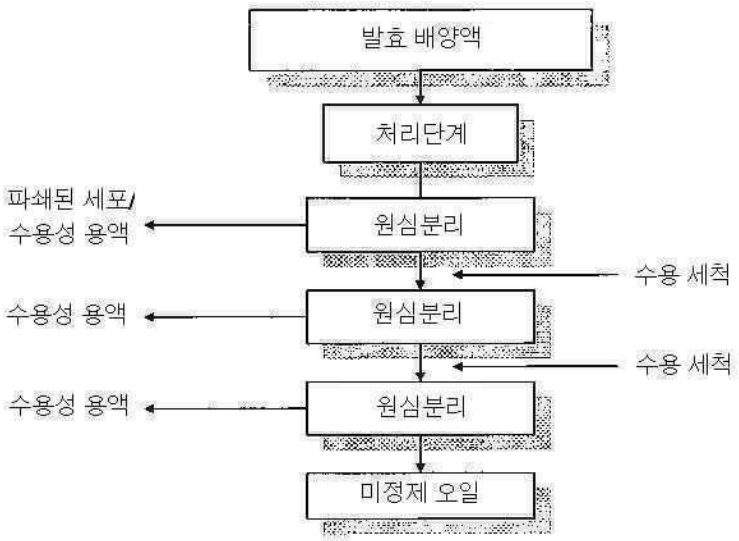
전체 청구항 수 : 총 19 항 심사관 : 한지혜

(54) 발명의 명칭 **무용매 추출 방법**

(57) 요 약

본 발명은 추출 용매로서 무극성 유기용매를 사용하지 않고 미생물로부터 지질을 추출하는 방법을 제공한다. 구체적으로, 본 발명은 세포를 파쇄하고, 파쇄된 세포 혼합물을 수용성 세척 용액을 이용하여, 전체적으로 비유화된 지질을 수득할때까지 세척하여, 수용성 화합물 및/또는 물질들을 제거함으로써 미생물로부터 지질을 추출하는 방법을 제공한다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

앵겔-하르트, 브라이언 에스.

미합중국 캘리포니아주 92117 샌디에고 캠버 드라이브 5639

베더, 조지 티,쓰리

미합중국 캘리포니아 92065 라모나 메인 스트리트 2674

특허청구의 범위

청구항 1

(a) 발효 배양액을 생산하기 위하여, 발효 배지에서 미생물을 배양하는 단계;

(b) 상기 발효 배양액 내에 존재하는 단백질의 적어도 일부를 용해시키기 위하여 상기 발효 배양액을 염기와 접촉시키는 단계;

(c) 세포 파쇄, 세포 파열 또는 세포 투과에 의해 상기 미생물의 세포 내 지질을 상기 발효 배양액으로 방출시키는 단계;

(d) 수용성 용액을 포함하는 하층과 유화된 지질을 함유하는 상층을 포함하는 상 분리 혼합물을 생성하기 위하여 상기 발효 배양액 내 밀도가 다른 물질들을 분리하는 단계;

(e) 상기 상 분리 혼합물로부터 상기 하층을 제거하는 단계;

(f) 상기 상층에 수용성 세척 용액을 첨가하는 단계;

(g) 상기 (f)단계의 혼합물로부터 밀도가 다른 물질들을 분리하는 단계;

(h) 상기 상 분리 혼합물로부터 상기 하층을 제거하는 단계; 및

(i) 상기 지질이 실질적으로 비유화 될 때까지 상기 (f) 내지 (h)단계를 반복하는 단계;를 포함하는 미생물로부터 지질을 수득하는 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 염기는 수산화물, 탄산염, 중탄산염, 및 이들의 혼합물로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 (d)단계는 상기 발효 배양액을 원심분리하는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 (d)단계의 수용성 용액은 고형의 세포 성분을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 미생물은 12g/L의 염화나트륨 미만의 염도에서 생장할 수 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 1항에 있어서,

상기 미생물은 지질을 적어도 30중량%를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 1항에 있어서,

상기 미생물은 조류, 균류, 박테리아 및 원생생물로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제 1항에 있어서,

상기 미생물은 트라우스토카이트리알(Thraustochytriales) 목의 미생물을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제 8항에 있어서,

상기 미생물은 트라우스토카이트리움(*Thraustochytrium*) 속, 쉬조카이트리움(*Schizochytrium*) 속 및 그들의 혼합물로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제 9항에 있어서,

상기 미생물은 기탁번호 ATCC 20888, ATCC 20889, ATCC 20890, ATCC 20891 및 ATCC 20892로 기탁된 미생물과, 이들로부터 유래한 돌연변이 균주 및 그들의 혼합물로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 미생물인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제 1항에 있어서,

상기 미생물은 시간당 리터당 적어도 0.1그램의 도코사헥사노인 산(docosahexaenoic acid)을 생산할 수 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제 1항에 있어서,

상기 지질의 적어도 30%가 도코사헥사노인 산인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제 1항에 있어서,

상기 상 분리 혼합물을 생성하는 단계는 5% 미만의 유기용매 중에서 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제 13항에 있어서,

상기 유기용매는 헥산(hexane)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제 1항에 있어서,

상기 상 분리 혼합물을 생성하는 단계는 4% 미만의 유기용매 중에서 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

제 1항에 있어서,

상기 상 분리 혼합물을 생성하는 단계는 2% 미만의 유기용매 중에서 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

제 1항에 있어서,

상기 상 분리 혼합물을 생성하는 단계는 1% 미만의 유기용매 중에서 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 18

제 1항에 있어서,

상기 상 분리 혼합물을 생성하는 단계는 유기용매의 부재 하에서 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 19

제 1항에 있어서,

상기 (c)단계는 상기 발효 배양액의 온도를 적어도 50로 증가시킴으로써 상기 미생물의 세포를 파쇄하여 파쇄된 세포 혼합물을 생성하는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 상당량의 무극성 유기용매를 사용하지 않고 미생물로부터 지질을 추출하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 오메가-3계의 고도의 불포화 지방산(omega-3 highly unsaturated fatty acid), 특히 도코사헥사에노 산(docosahexaenoic acid, DHA)이 다량 존재하는 지질 혼합물의 생산에 있어, 전형적인 미생물 지질의 제조 방법은 발효기(fermentor), 저장기(pond) 또는 생물 배양기(bioreactor) 내에서 원하는 지질을 생산할 수 있는 미생물의 배양, 상기 미생물체 분리, 그의 건조 및 헥산(hexane)과 같은 무극성 용매를 이용한 세포내 지질의 추출 과정을 포함한다. 일반적으로 미생물의 세포내 지질은 건조된 세포를 파열(분쇄)한 후에 추출한다. 추출한 지질은 고순도 및/또는 고품질의 지질로 생산하기 위하여, 추가적으로 정제할 수 있다. 미생물은 일반적으로 발효 배양액을 먼저 물로 희석하고, 원심분리함으로써 분리한다. 그후에 세포를 건조시키는데, 만약 이로부터 지질을 즉시 또는 신속하게 추출하지 않는다면 지질의 손상을 방지하기 위하여 진공봉인이 가능한 용기(vacuum-sealed bags)에 보관한다.

[0003] 공교롭게도 건조 과정이 제대로 수행되지 않아 미생물이 열에 노출되면 지질의 품질이 저하되는 해를 입을 수 있다. 진공 봉인된 용기가 새면, 미생물이 공기에 노출되어 지질의 품질을 더욱 떨어뜨릴 수 있다. 또한, 만약 건조된 미생물을 산화방지제로 처리하지 않으면, 지질이 공기와 빛에 노출되어 더욱 손상될 수 있다. 예를 들면, 카로테노이드, 젠토필, 그리고 DHA 같은 긴쇄 지방산들은 공기 및/또는 빛에 의한 산화에 의하여 손상될 수 있다. 게다가, 어떤 경우에는 조작자가 건조된 미생물에 노출되어 이들의 안전과 건강에 위험을 야기할 수 있는 알레르기 반응을 일으킬 수 있다.

[0004] 또한, 산업적인 규모의 생산에 있어서 지질 추출에 사용되는 다량의 휘발성 및 가연성이 있는 무극성 유기용매는 위험한 조작환경을 조성할 수 있다. 추출과정시 무극성 유기용매의 사용은 폭발-내구성 오일 회수 시스템을 필요로 하게 되므로 지질 추출 비용을 증가시킬 수 있다. 게다가, 미생물로부터 지질을 추출할 때 무극성 용매의 사용은, 적절한 처리 방법이 요구되는 무극성 용매 폐기물을 발생시켜 지질 추출의 전체 생산 비용을 더욱 증가시킨다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 그러므로, 무극성 용매의 사용이 필요치 않은, 미생물의 지질 추출 방법에 대한 요구가 있어 왔다. 또한, 추출하기에 앞서 미생물을 건조하는 고비용의 단계가 필요치 않은 미생물의 지질 추출 방법에 대한 요구가 있어 왔다.

과제의 해결 수단

[0006] *본 발명의 한 실시예에서는 하기의 단계를 포함하는 미생물의 지질 수득 방법을 제공한다;

[0007] (a) 파쇄된 세포 혼합물을 생산하기 위하여 미생물 세포을 파쇄하고;

[0008] (b) 하층 및 지질을 포함하는 상층으로 구성된 상 분리 혼합물을 생성하기 위하여 파쇄된 세포 혼합물을 처리하고;

[0009] (c) 지질을 포함하는 상층으로부터 하층을 분리하고; 그리고,

[0010] (d) 상층으로부터 지질 및/또는 지질 포함부를 수득한다.

[0011] 본 발명의 다른 실시예에서는 하기의 단계를 포함하는 미생물의 지질 수득 방법을 제공한다:

[0012] (a) 배양 배지에서 미생물을 배양하고;

[0013] (b) 세포내 지질이 배출되도록 상기 배양배지와 미생물 세포를 처리하고;

[0014] (c) 지질을 포함하는 상층 및 하층이 형성되도록, 배출된 세포내 지질을 포함하는 배양 배지를 중력을 이용하여 분리되도록 하고;

[0015] (d) 하층부로부터 상층부를 분리하고;

[0016] (e) 지질과 물간에 형성된 유화 상태를 파괴하기 위하여 상층부를 처리하고; 및,

[0017] (f) 미정제 지질을 회수한다.

[0018] 본 발명의 또다른 실시예에 따라, 미생물로부터 지질을 회수하기 위한 하기의 단계를 포함하는 방법이 제공된다;

[0019] (a) 배양 배지에서 미생물을 배양하고;

[0020] (b) 세포의 건조과정 없이 세포내 지질을 배출하도록, 상기 배양 배지로부터 미생물 세포를 처리하고;

[0021] (c) 지질을 포함하는 상층 및 하층이 형성되도록, 배출된 세포내 지질을 포함하는 배양 배지를 중력을 이용하여 분리되도록 하고;

[0022] (d) 하층부로부터 상층부를 분리하고;

[0023] (e) 지질과 물간에 형성된 유화상태를 파괴하기 위하여 상층부를 처리하고;및,

[0024] (f) 미정제 지질을 회수한다.

[0025] 바람직하게는, 미생물은 발효기 내의 발효 배지에서 배양한다. 이에 선택적으로 미생물은 광생물 배양기 또는 저장기에서 광합성이 가능한 상태로 배양할 수 있다. 본 발명의 미생물은 바람직하게는 지질이 풍부한 미생물이고, 더욱 바람직하게는, 조류, 박테리아, 균류 및 원생생물을 포함하는 그룹에서 선택할 수 있고, 더욱 바람직하게는 갈조류, 녹조류, 와편모충류 (dinoflagelates), 효모, 모르티에렐라(Mortierella)속 균류 및 스트라메노파일(Stramenopiles)을 포함하는 그룹에서 선택할 수 있다. 미생물은 바람직하게는 모르티에렐라 속, 크립테코디니움 (Crypthecodinium)속 및 트라우스토카이트리알(Thraustochytriales) 목을 포함하고, 더욱 바람직하게는 트라우스토카이트리움(Thraustochytrium), 쉬조카이트리움 (Schizochytrium)속 및 그의 혼합물에서 선택할 수 있고, 더욱 바람직하게는 ATCC 20888, ATCC 20889, ATCC20890, ATCC 20891 및 ATCC 20892와 동일한 특성을 가지는 미생물, 균주 모르티에렐라 슈무케리(Mortierella schmuckerii), 균주 크립테코디니움 코니(Crypthecodinium cohnii), 상기의 미생물에서 유래한 돌연변이 균주 및 그들의 혼합물을 포함하는 그룹에서 선택될 수 있다.

[0026] 세포의 처리는 지질이 배출되도록 세포를 파쇄하고(lysing), 파열시키고 (rupturing) 또는 투과 가능도록 (permeabilizing) 처리하는 것을 포함한다. 본 발명에서 사용된 '파쇄하다', '파쇄시키는', '파쇄되는' 등의 용어는 일반적으로 세포내 지질이 배출되도록 하는 처리를 언급하는 것이며, 세포를 파괴시키거나 또는 투과 가능한 상태로 만드는 것을 포함한다. 바람직하게, 세포 처리는 열처리하고, 염기상태에 노출시키고, 킬레이트 화합물에 노출시키는 방법, 또는 상기 방법의 조합으로 구성되는 그룹에서 선택될 수 있다. 더욱 바람직하게는, 세포의 파쇄 또는 파열은 세포를 염기 상태에 노출시키고, 킬레이팅 화합물에 노출시키고 또는 이의 혼합 처리를 하면서 적어도 50℃로 열처리를 하는 것을 포함한다.

[0027] 바람직하게는, 중력에 의한 분리는 배출된 세포내 지질을 포함하는 발효 배지를 스택-디스크-(stacked-disc-), 분리기-(separator-) 또는 경사-(decanter-) 타입의 원심분리기를 이용하는 것을 포함한다.

[0028] 분리된 파쇄 세포 혼합물은 파쇄된 세포의 고형물을 포함하는 수용성 용액층인 하층과 지질을 포함하는 상층을 포함한다. 상층과 하층은 원심분리에 의하여 분리할 수 있다. 지질은 유화된 상태로 존재할 수 있다. 상층은 지질이 충분히 비유화 상태가 되도록 추가적으로 수용성 세척 용액을 이용하여 세척할 수 있다. 바람직하게, 유화상태의 파괴는 물, 알코올, 아세톤 또는 이들의 혼합물과 유탁액(emulsion)을 혼합하고, 중력을 이용하여 분리하는 것을 포함한다. 바람직하게, 상기 과정은 헥산과 같은 무극성 유기 용매의 사용없이 수행된다.

[0029] 본 발명의 지질 추출 과정에 있어서, 발효과정을 거치는 미생물을 이용하는 것을 포함할 때, 추출 과정은 수산화물, 탄산염, 중탄산염, 인산염 및 상기 혼합물을 포함하는 그룹으로부터 선택한 염기를 첨가함으로써 발효 배지에서 적어도 단백질 함유 화합물의 일부를 용해시키는 과정을 포함한다.

[0030] 본 발명의 추출 과정은 또한 적어도 약 50℃의 온도로 미생물을 열처리하는 것을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 세포의 파쇄를 용이하게 하도록 하기 위하여 배양 배지에 염기와 같은 화학적 화합물을 첨가한다.

[0031] 열처리에 대한 양자택일적 방법으로, 세포들은 EDTA와 같은 킬레이트 화합물을 보조적으로 사용하여 파쇄할 수 있다. 킬레이트 화합물은 세포의 파쇄 또는 파열을 용이하게 하는 것 뿐만 아니라, 발효 배지에서 철 또는 구리와 같은 자유 라디칼을 생성하는 금속 이온들을 킬레이트화함으로써(결합함으로써), 추출 과정중 지질의 산화 방지를 돕는다. 킬레이트 화합물은 식품 등급 또는 미국 식품 의약품국 합격증(GRAS (Generally Recognized As Safe))을 받은 것이 바람직하다. 효과적인 킬레이트 화합물은 EDTA, 시트르산(citric acid) 또는 시트르산염(citrate), 젖산, 트리소듐 포스페이트(trisodium phosphate), 폴리포스페이트 (polyphosphate), 헥사메타포스페이트(hexametaphosphate), EGTA, DTPA, 파이트산 (phytic acid) 또는 CDTA 및 이들 화합물의 다른 염의 형태를 포함한다. 본 발명의 한 실시예에서, 소듐(sodium) EDTA는 세포벽을 견고하게 해주는 역할을 하는 2가 양이온을 킬레이트화함으로써 세포벽을 손상시키기 위해 첨가된다. 상기 과정은 고온에서 적은 양의 EDTA를 첨가하거나, 또는 저온에서 고농도의 EDTA를 첨가하여 수행할 수 있다. 예를 들면, 본 발명에서는 DHA가 다량 존재하는 쉬조카이트리움 속(Schizochytrium sp.)의 발효 단계 마지막에 EDTA를 배지에 첨가함으로써 세포를 투과가능하게 하고, 그리고/또는 세포를 파열시킬 수 있다. 세포 파열을 용이하게 하기 위하여는 30℃에서 10,000 ppm의 농도가 요구되고, 50℃에서는 5,000 ppm의 농도가, 70℃ 이상의 온도에서는 1,000 ppm 이하의 농도가 효과적이다.

[0032] 킬레이트화제(Chelators)는 균질화(homogenization)와 같은 물리적 방법에 의하여 세포를 분쇄할 때, 이를 더욱 용이하게 하기 위하여 발효 배양액에 첨가될 수 있다. 세포를 파쇄하는데 있어, 킬레이트화제와 함께 세포 내부의 삼투압을 증가시킬 수 있는 물 또한 첨가될 수 있다.

[0033] 미생물은, 바람직하게는, 약 12g/L 이하의 염화나트륨 염도에서 생장할 수 있으며, 더욱 바람직하게는 약 5 g/L 이하의 염화나트륨 염도에서, 매우 바람직하게는 3 g/L 의 염화나트륨 염도 이하에서 생장할 수 있다. 바람직하게 미생물은 약 7 g/L의 나트륨 농도 및 약 250 mg/L의 염소 농도에서 생장할 수 있다. 바람직하게 염소의 양은 약 70에서 150 mg/L로 존재한다.

[0034] 본 발명의 미생물은, 바람직하게는, 적어도 20 중량%의 지질을 포함하고, 더욱 바람직하게는 적어도 약 30 중량%의 지질을 포함하며, 매우 바람직하게는, 적어도 약 40 중량%의 지질을 포함한다. 선택적으로 적어도 약 20%, 더욱 바람직하게는 적어도 지질의 약 20%가 콜레스테롤(cholesterol), 파이토스테롤(phytosterols), 데스모스테롤(desmosterol), 토코트리에놀(tocotrienols), 토코페롤(tocopherols), 유비퀴논(ubiquinones), 카로테노이드(carotenoids)와 베타-카로틴(beta-carotene), 루테인(lutein) 라이코핀(lycopene), 아스타젠틴(astaxanthin), 지아젠틴(zeaxanthin), 칸타젠틴 (canthaxanthin)과 같은 젠토필 (xanthophylls), 그리고 변형된 리놀레인 산(conjugated linoleic acids)과 같은 지방산, 에이코사펜타노인 산(eicosapentaenoic acid), 도코사펜타노인 산(docosapentaenoic acid)과 같은 오메가-3계 및 오메가-6계의 고도의 불포화 지방산, 도코사헥사노인 산(docosahexaenoic acid), 아라키도인 산(arachidonic acid), 스테아리도닌 산(stearidonic acid), 다이호모감마리놀레인 산(dihomogammalinolenic acid) 및 감마-리놀레인 산 (gamma-linolenic acid) 또는 상기의 혼합물이고, 바람직하게는 적어도 30%, 그리고 더욱 바람직하게는 적어도 40%이다.

[0035] 본 발명의 한 특정 관점으로서, 미생물은 콜레스테롤, 파이토스테롤, 데스모스테롤, 토코트리에놀, 토코페롤, 유비퀴논, 카로테노이드와 베타-카로틴, 루테인 라이코핀, 아스타젠틴, 지아젠틴, 칸타젠틴과 같은 젠토필, 그

리고 변형된 리놀레인 산과 같은 지방산, 에이코사펜타노인 산, 도코사펜타노인 산과 같은 오메가-3계 및 오메가-6계의 고도의 불포화 지방산, 도코사헥사노인 산, 아라키도인 산, 스테아리도닌 산, 다이호모감마리놀레인 산 및 감마-리놀레인 산 또는 상기의 혼합물을 포함하는 지질 혼합물을 한시간에 리터당 적어도 약 0.1 그람 생산할 수 있고, 더욱 바람직하게는 적어도 약 0.2 g/L/h, 매우 바람직하게는 적어도 약 0.3 g/L/h, 가장 바람직하게는 적어도 약 0.4 g/L/h를 생산할 수 있다.

[0036] 본 발명의 다른 관점으로서, 미생물은 조류, 균류, 박테리아 및 원생생물로 구성되는 그룹으로부터 선택한다. 바람직하게는 상기 미생물은 트라우스코카이트리알(Thraustochytriales) 목이다. 더욱 바람직하게는 미생물은 트라우스토카이트리움(Thraustochytrium)속, 쉬조카이트리움(Schizochytrium)속 및 그의 혼합물로부터 선택한다. 가장 바람직하게는, 미생물은 ATCC 20888, ATCC 20889, ATCC20890, ATCC 20891 및 ATCC 20892와 동일한 특성을 가지는 미생물, 이들로부터 유래한 돌연변이 균주 및 그들의 혼합물을 포함하는 그룹에서 선택할 수 있다. 바람직하게, 미생물은 ATCC 20888 및 ATCC 20889의 동정 특성을 가지는 그룹으로부터 선택하며, 더욱 바람직하게 ATCC 20888, 이로부터 유래한 돌연변이 균주 및 이의 혼합물로부터 선택한다.

[0037] 본 발명은 미생물의 지질을 추출, 회수, 분리 또는 수득하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 추출 방법은 다양한 미생물로부터 다양한 지질을 추출하는데 적용가능하다. 예를 들면, 콜레스테롤, 파이토스테롤, 데스모스테롤, 토코트리에놀, 토코페롤, 유비퀴논, 카로테노이드와 베타-카로틴, 루테인 라이코핀, 아스타젠틴, 지아젠틴, 칸타젠틴과 같은 젠토필, 그리고 변형된 리놀레인 산과 같은 지방산, 에이코사펜타노인 산, 도코사펜타노인 산과 같은 오메가-3계 및 오메가-6계 고도의 불포화 지방산, 도코사헥사노인 산, 아라키도인 산, 스테아리도닌 산, 다이호모감마리놀레인 산 및 감마리놀레인 산 또는 상기의 혼합물을 포함하는 지질 혼합물, 더욱 바람직하게는 도코사헥사노인 산(DHA), 에이코사펜타노인 산(EPA), 및/또는 도코사펜타노인 산(DPA)(즉, DPA의 오메가-3계의 형태)과 같은 오메가-3계의 고도의 불포화 지방산, 특히 동일하게 생산된 미생물로부터 상대적으로 다량의 DHA를 포함하는 지질; 그리고 동일하게 생산된 미생물로부터 아라키도닌산과 도코사펜타노인 산(DPA)(즉, DPA의 오메가-6계의 형태)과 같은 오메가-6계의 고도의 불포화 지방산을 포함하는 지질을 추출하는데 적용가능하다. 오메가-3계의 고도의 불포화 지방산을 상대적으로 다량 생산하는 전형적인 미생물은 바클레이(Barclay)에게 특허된 미국 특허번호 5,340,594 및 5,0340,742에 공개되어 있으며, 상대적으로 다량의 아라키도닌 산을 생산하는 전형적인 미생물은 바클레이에게 특허된 미국 특허번호 5,583,019에 공개되어 있다. 상기 특허들은 전부 참조로 본 명세서에 기재되어 있다.

[0038] 그러나, 간략하게 나타내기 위하여 본 발명의 상세한 설명에는 동일하게 생산된 미생물로부터 오메가-3계의 고도의 불포화 지방산을 포함하는 지질을 추출하는 경우, 특히 상대적으로 다량의 DHA를 생산하는 미생물로부터 지질을 추출하는 경우에 대하여 기재되어 있다. 그러나, 전체적으로 본 발명은 이에 제한되지 않으며, 당업계에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명에 논의된 기술로써 본 발명의 개념을 다양한 지질 성분을 생산하는 다른 미생물에게 적용할 수 있다. 이들 미생물은 인지질(phospholipids); 자유 지방산; 트리글리세리드(triglycerides) 지방산을 포함하는 에스테르(esters) 지방산; 스테롤(sterols); 색소(즉 카로테노이드(carotenoids) 및 옥시카로테노이드 xycarotenoids))및 그밖의 지질, 그리고 파이토스테롤(phytosterols), 에르고티오닌(ergothionine), 리포인 산 및 베타-카로틴, 토코트리에놀과 토코페롤을 포함하는 항산화제 등 지질이 결합된 화합물 등의 다양한 지질을 생산하는 균류, 원생생물, 조류 및 박테리아와 같은 미생물을 포함한다. 바람직한 지질 및 지질 결합 화합물은, 하기에 제한적이지는 않지만 콜레스테롤, 파이토스테롤, 데스모스테롤, 토코트리에놀, 토코페롤, 유비퀴논, 카로테노이드와 베타-카로틴, 루테인 라이코핀, 아스타젠틴, 지아젠틴, 칸타젠틴과 같은 젠토필, 그리고 변형된 리놀레인 산과 같은 지방산, 에이코사펜타노인 산, 도코사펜타노인 산과 같은 오메가-3계 및 오메가-6계의 고도의 불포화 지방산, 도코사헥사노인 산, 아라키도인 산, 스테아리도닌 산, 다이호모감마리놀레인 산 및 감마-리놀레인 산 또는 상기의 혼합물을 포함하는 지질 혼합물을 포함한다. 간략하게 나타내기 위하여, 다른 특별한 언급이 없다면 지질이라는 용어는 지질 및 지질 결합 화합물을 의미한다. 본 발명에서 이용될 수 있는 적당한 다른 지질과 미생물은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명할 것이다.

[0039] 전형적인 미생물 지질(특히 DHA와 같이 오메가-3계의 고도의 불포화 지방산을 포함하는 오일)을 제조하는 과정은 발효기 내에서 DHA를 생산하는 미생물을 배양하고, 상기 미생물을 분리하고, 미생물체를 건조시키며, 헥산과 같은 무극성 유기 용매로 세포내 지질을 추출하는 과정을 포함한다. 추출된 지질은 일반적으로 고순도 및/또는 고품질의 지질로 생산하기 위해 추가적으로 정제된다. 미생물의 분리는 물로 발효 배양액을 희석하고, 이를 원심분리하는 것을 포함한다.

[0040] 미생물을 분리한 후, 지질을 즉시 또는 신속하게 추출하지 않는다면, 분리된 미생물은 드럼 건조기와 같은 것을

이용하여 건조시키고 진공봉인이 가능한 용기에 보관하여 지질의 손상을 막는다. 공교롭게도 건조 과정이 제대로 수행되지 않아 미생물이 열에 노출되면 지질의 품질이 저하되는 해를 입을 수 있다. 진공 봉인된 용기가 새면, 미생물이 공기에 노출되어 지질의 품질을 더욱 떨어뜨릴 수 있다. 또한, 만약 건조된 미생물을 산화방지제로 처리하지 않으면, 지질이 공기와 빛에 노출되어 더욱 손상될 수 있다.

[0041] 발효 배양액으로부터 미정제 오일을 바로 회수하면 상술한 문제를 피할 수 있다. 무극성 유기 용매를 이용하는 추출 단계를 생략하면 생산 비용을 절감할 수 있고, 조작자가 건조 미생물에 노출되어 알레르기 반응을 일으킬 수 있는 경우도 줄일 수 있다.

[0042] 본 발명은 무극성 유기용매의 추출과정이 생략된 무용매 추출 방법을 이용하여 미생물로부터 지질을 수득하는 방법을 제공한다. 무용매 추출 방법이라는 용어는 수용성 또는 극성 용매가 사용될 때, 수용성 또는 극성 용매가 무극성 유기 용매를 약5%이하, 바람직하게는 4%이하, 더욱 바람직하게는 2%이하, 그리고 가장 바람직하게는 1%이하로 포함하는 추출방법을 언급하는 것이다.

[0043] 그러나, 용매는 정제 과정과 같은 이후 단계에서는 사용될 수 있다.

[0044] 본 발명에서 제공하는 방법은 바람직하게는 발효 단계로부터 미생물을 수득하거나 분리하는 것을 포함할 수 있다. 콩에서 오일을 추출할 때 콩을 반드시 건조시키는 것과 같은 선행기술의 일반적인 방법과는 대조적으로 본 발명의 방법은 추출 과정 이전에 건조 단계가 필요치 않다. 따라서, 본 발명에서 제공하는 방법은 물을 적어도 약 10 중량%, 바람직하게는 적어도 약 20 중량%, 더욱 바람직하게는 약 30 중량%, 가장 바람직하게는 적어도 약 50 중량% 포함하는 미생물체로부터 지질을 추출하는데 적용될 수 있다. 미생물을 발효 과정으로부터 수득할 때, 본 발명에서 제공하는 방법은 배양액 내에 존재할 수 있는 단백질 성분의 화합물을 용해시킬 수 있도록 발효 배양액에 염기를 첨가하는 것을 포함할 수 있다. 염기는 수용액에서 알칼리(염기) 반응, 즉 양성자를 결합시키고 수산화 이온을 해리시키는 반응을 나타내는 물질이다. 염기는 배양액에 존재할 수 있는 단백질 성분 화합물의 적어도 일부를 가수분해 또는 용해시킬 수 있을 정도로 강력하여야 한다.

[0045] 단백질을 용해시키는데 사용되는 염기는 화학계에서 통상적 기술로서 잘 알려져 있다. 본 발명에서 제공하는 방법에 있어 사용되는 일례의 염기는 이에 제한되지 않지만, 수산화물, 탄산염과 리튬, 소듐, 포타슘, 칼슘 및 마그네슘 탄산염과 같은 중탄산염을 포함한다. 트리소듐 포스테이트 같은 염기적 인산염처럼 매우 염기적인 화합물 또한 사용될 수 있다.

[0046] 본 발명에서 제공하는 방법은 세포 내에 존재하는 지질을 배출시키기 위하여 미생물 세포를 파열 또는 분쇄시키는 과정을 포함할 수 있다. 세포는 화학적 방법; 열처리; 하기에 제한되지 않지만 프렌치 프레스(french press), 압착기(mills), 초음파분쇄기(ultrasonication), 호모지나이제이션(homogenization) 및 증기 파열을 이용하는 기계적 방법; 및 그들의 조합 방법을 포함하는 기존에 알려진 방법들을 이용하여 파쇄할 수 있다. 세포를 열처리 하는 방법에 있어, 미생물을 포함하는 발효 배양액은 세포, 즉 미생물의 세포벽이 손상되거나 붕괴될 때까지 열을 가한다. 전형적으로, 발효 배양액은 적어도 약 50℃까지 가열하고, 바람직하게는 적어도 약 75℃, 더욱 바람직하게는 적어도 약 100℃까지, 그리고 가장 바람직하게는 적어도 약 130℃까지 가열한다. 본 발명에서 제공하는 방법의 중요한 관점은 추출된 지질이 손상되는 온도 이하로 온도를 유지하는 것이다. 열에 의해 미생물의 세포벽을 파쇄하는 방법은 세포벽이 단백질로 구성된 미생물에게 유용하다. 상기 과정동안 산소에 의한 지질의 산화를 막기 위하여 발효기의 빈 공간은 질소 또는 다른 불활성 가스로 채울 수 있다.

[0047] 배양액을 가열하는 것은 또한 단백질을 변성시키고 단백질을 포함한 유기 물질을 용해시키는 것을 돕는다. 발효 배양액을 열처리하는 단계는 내선 열교환기 (in-line heat exchanger)를 사용하는 방법을 포함한 기존의 알려진 방법, 바람직하게는 발효 배양액 내로 증기를 살포하고 배양액을 90분 이내로, 바람직하게는 60분 이내로, 더욱 바람직하게는 30분 이내로 원하는 온도를 유지하는 방법에 의하여 수행할 수 있다. 본 발명에서 제공하는 무용매 추출 방법은 지질로부터 사용된 발효 배양액을 적어도 부분적으로 분리하는 것을 포함한다. 전형적으로 이는 원심분리, 즉 배양액을 스택-디스크, 분리기 또는 경사 원심분리기를 통과시키고, 유탁액층의 지질을 수집하는 방법으로 수행된다. 혼합액을 원심분리시키면 하층과 상층으로 2 개의 층으로 분리된다. 전형적으로, 하층은 세포 찌꺼기의 대부분을 포함하는 수용성층이다. 유화된 지질을 포함하는 상층은 물로 희석하고, 두개의 층으로 재분리하여 상층을 다시 수집한다. 이러한 물로의 희석, 분리 및 수집과정(즉 세척과정)은 과정 전반에 걸쳐 물을 공급하고 하층을 제거하는 방법으로 계속적으로 수행되거나, 일정 단계로서 수행할 수 있다. 상기 세척 과정은 비록 일부 유탁액이 남아있다 하더라도 완전히 비유화된 지질층이 수득될때까지 일반적으로 반복한다. 유탁액의 오일-물 경계면은 세척과정에 의해 제거되는 잔류 세포 찌꺼기에 의하여 안정화되는 것으로 여겨진다. 세척 과정동안, 첨가하는 물의 양은 지질 함유량을 증가시키기 위하여 연속적으로 감소시킨다. 공급하

는 물의 양을 너무 빨리 감소시키면 수용성 층으로의 지질 손실이 발생하고, 너무 천천히 감소시키면 세척 과정이 비효과적으로 수행된다. 분리된 수용성 층을 관찰, 분석하면 공급하는 물의 적정 비율을 쉽게 결정할 수 있다. 일반적으로 지질층, 즉 상층은 색깔이 나타나므로 많은 경우 공급하는 물의 적정 비율은 지질층으로부너 분리되는 수용성층의 색깔을 분석, 관찰하여 간단히 결정할 수 있다.

[0048] 선택적으로, 그리고 바람직하게는 유탁액이 붕괴되고, 오일 제거 과정에 의해 오일을 회수하는 방법은 전부 참조로 나타나 있는 WO 96/05279에 약술되어 있다. 상기 과정중 유화상태를 깨뜨리기 위하여 알코올 및/또는 아세톤과 같은 수용성 화합물을 오일/물 유탁액에 첨가하고, 이 혼합물은 원심분리에 의하여 분리한다. 분리된 지질은 일반적으로 식물성 오일을 정제하는 것과 동일한 방법으로 추가적으로 정제할 수 있다. 간략히, 지질 정제 과정은 일반적으로 지질에 인산을 첨가하고, 이후 자유 지방산을 중화시키기 위한 수산화나트륨을 첨가하여 인지질을 수화시키는 과정을 포함한다. 이 화합물들은 원심분리를 통하여 제거한다. 그리고나서, 지질 내에 남아있는 수화 인지질(gums)과 중화된 지방산(soapstock)을 제거하기 위한 물 세척 과정을 수행한다. 이후 상기 지질을 트라이실(Trysil)과 일반 표백 클레이를 사용하여 표백한다. 또한 킬레이트화에 의하여 2가 금속이온을 제거하기 위하여 시트르산을 첨가한다. 정제된 지질을 생산하기 위하여 트라이실과 표백 클레이는 여과시켜 제거한다. 표백된 지질은 지질 내에 존재할 수 있는 높은 녹는점을 가진 화합물을 제거하기 위하여 저온에서 여과한다.; 그러나 상기 과정은 일반적으로 드물게 요구된다.

[0049] 상기 지질은 작은 분자량의 화합물 제거를 위하여, 추가적으로 정제될 수 있다. 전형적으로, 이러한 화합물은 고온의 고압 진공 상태에서 증기를 살포하여 제거한다. 이 과정은 또한 존재하는 과산화 결합을 끊고, 냄새를 감소 또는 제거하며, 오일의 안정성이 향상되도록 돕는다. 그 이후에 항산화제를 첨가하여 지질의 안정성을 증가시킬 수 있다.

[0050] 정제 과정 동안 분리된 지질은 포화 지방산과 같이 높은 녹는점을 가진 화합물을 제거하기 위하여 방비 처리될(winterized) 수 있다. 상기 방비 처리 과정은 지질층에 존재하는 높은 녹는점을 가진 화합물을 제거하기 위하여, 일반적으로 분리한 지질을 헥산과 같은 유기용매로 녹이고, 그 용액을 차게하여 여과시키는 과정을 포함한다. 방비 처리 과정은 일반적으로 분리한 지질이 불투명할 때 지질을 투명하게 생산할 수 있다. 헥산과 같은 용매는 상기에 기재된 정제 과정과 같은 단계에서 사용될 수 있다. 이에 선택적으로, 분리한 지질은 냉각시켜 불순물을 고체화시키고 용매의 사용없이 여과시킬 수 있다.

[0051] 상기에 약술한 정제, 표백, 탈취 과정은 트리글리세리드가 풍부한 지질 혼합물에 주로 사용된다. 선택적으로, 또는 이러한 과정에 더하여 색소 또는 카로티노이드와 같은 지질은 다양한 용매로의 분할, 크로마토그래피 방법 등에 의하여 분리, 정제될 수 있다.

[0052] 반면, 본 발명에서 제공하는 방법은 발효 과정으로부터 미생물을 분리하는 과정이 포함될 수 있지만, 본 발명의 잇점 중 하나는 미생물의 발효와 지질의 분리 과정을 동일한 용기에서 수행할 수 있다는 것이다. 예를 들면, 발효가 끝난 후에 발효 용기에 염기를 첨가하고, 그 혼합물에 세포 파쇄를 위한 열처리를 가할 수 있다. 하층과 상층으로 상이 분리되면, 이후의 과정에 사용되는 상층을 다른 용기로 옮기거나, 발효 용기의 밑부분을 통하여 하층을 배출시켜 제거하고, 남아있는 상층으로 동일한 발효 용기내에서 이후의 과정을 수행할 수도 있다.

[0053] 만약, 연속 발효 장치에서 세포가 배양되거나, 배지가 세포가 생장하기에 용이하지 않거나(불충분하거나), 광합성 미생물 배양 장치에서 배양되어, 미생물 배지의 세포내 지질 농도는 높지만(약 20% 이상) 세포수가 적으면(약 40 g/L 이하), 본 발명의 방법을 시작하기에 앞서 원심분리, 여과 또는 침전방법을 통하여 세포의 농도를 높일 수 있다.

발명의 효과

[0054] 본 발명에 따른 무용매 추출 과정은 재현 가능하고, 이로부터 추출된 지질은 방법 수행 및 생산 품질의 견지에서 헥산 추출 과정으로부터 수득된 지질과 차이가 없다. 본 발명의 무용매 추출 방법으로부터의 최종 생산물은 통상의 헥산 사용을 기본으로 하는 추출 방법으로부터 생산된 지질과 실질적으로 동등하다.

도면의 간단한 설명

[0055] 도1은 본 발명의 실험예에 따른 무용매 추출 방법에 대한 흐름도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0056] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 구체적으로 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 구체적으로 설명하는 것으로, 이들 실시예에 의해 본 발명의 범위가 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자들에게 있어서 자명할 것이다.

[0057] **실험예**

[0058] 새로운 무용매 추출 방법으로부터 얻은 미정제 오일을 이용하여 완전히 정제된 3가지 샘플의 오일을 생산함으로써 방법의 재현가능성을 밝혔다. 헥산을 이용하여 추출한 샘플은 대조군으로서 사용하기 위하여 완전히 정제하였다. 발효, 추출 및 오일 분리 단계는 대규모로 수행한 반면 오일 정제 연구는 소규모로 수행하였다.

[0059] 완전 정제된 오일 샘플은 방법의 재현가능성을 증명하기 위하여 분석하였다.

[0060] **발효:**

[0061] 오일이 풍부한 미생물(쉬조카이트리움 속)은 이후의 추출 과정에 사용될 발효 배양액을 생산하기 위하여 1200 갤런의 발효기 내에서 배양되었다. 세 가지의 무용매 추출 과정에 사용될 초기 배양액을 생산하기 위하여 하나의 배치가 사용되었다. 발효는 13 g/L로 포도당 농도를 조절하면서 94 시간동안 진행하였고, 이후 옥수수 시럽의 공급을 중지하였다. 4 시간 이후에 잔류 포도당의 농도는 5 g/L 이하로 떨어졌다. 최종 배양 시간은 98 시간이었다. 상기의 최종 배양액은 958 갤런이었다. 최종 수득율은 세포 건량으로 146 g/L였다. 과정 중간의 오염 점검 및 최종 배양액 샘플의 철저한 분석에 의하여 어떠한 오염의 징후도 나타나지 않았다.

[0062] **헥산-추출 조절 샘플:**

[0063] 대조군 샘플로서 발효 배치로부터 배양액을 소량 취한후 드럼-건조시켜 헥산으로 추출하였다. 중간 생체량은 이중-드럼 건조기(double-drum dryer)를 사용하여 회수하였다. 상기 지질의 분석결과는 표 1에 나타나 있다.

표 1

[0064] 드럼 건조된 쉬조카이트리움 속 생체량의 분석

매개변수	값
DHA 함량(지방산 메틸에스터 분석법(FAME) 기준)	35.7%
오일 함량	62.7%
과산화물 값(meq/kg)	2.6
총 평판 배양량(cfu/g)	<50
DHA 함량*	20.3%
지방산 메틸에스터 함량	56.9%
* 세포의 건량 기준	

[0065] **무용매 추출 과정:**

[0066] 미정제 오일은 발효 배양액으로부터 약 400-갤런씩 세번 취하여 수득하였다. 발효기로부터 취한 각각의 400 갤런 배양액은 가성/열처리 단계부터 개별적으로 실험을 수행하였다. 각각 배양액은 리터당 45% KOH를 20 g 처리하고, 배양액 전체에 증기를 통과시켜 약 30분 동안 130℃로 열처리하였다. 상기 배양액으로부터 통상적 규모의 Westfalia HFA-100 스택-디스크 원심분리기를 이용하여 미정제 오일을 회수하였다. 표 2에 과정상의 다양한 요소에 대한 결과가 요약되어 있으며, 최종 미정제 오일에 대한 분석은 표 3에 나타나 있다.

표 2

[0067] 무용매 추출 방법의 각 단계 분석 결과

	SFE-1	SFE-2	SFE-3
배양액 처리			
처리된 배양액의 부피	288 gal	288 gal	258 gal
최종 처리 pH	7.5	8.0	8.7
열처리 후의 최종부피	388 gal	398 gal	308 gal
압출물로부터의 부피 증가율	34.7%	38.2%	19.4%

제 1차 통과 유탁액			
총 부피(gal)	180	133	149
측정 오일농도(w/w)	12.0%	24.5%	16.1%
겉보기 밀도(g/mL)	0.986	0.991	0.999
오일 분리			
총 미정제 오일 회수량(lb)	182	165	174
DHA 오일의 샘플 지정번호	SF1A	SF2A	SF3A

표 3

[0068] 무용매 추출 과정으로 추출된 DHA 오일 분석

매개변수	SF1A	SF2A	SF3A
DHA 함량(%FAME)	39.0%	38.6%	39.2%
과산화물 값(meq/kg)	4.6	1.8	2.0
산도(mgKOH/g)	N/D	N/D	N/D
수분 함량	N/D	N/D	N/D

[0069] **정제:**

[0070] 미정제 오일로부터 각각 취한 일정량의 샘플은 헥산 추출 대조군으로부터 취한 미정제 오일과 동일하게 소규모로 방비처리하고, 정제, 표백, 탈취하였다. 과정 중 여러 단계에서의 회수 효율을 포함하여 상기 소규모의 실험에 대한 여러가지 자료가 표 4에 나타나 있다. 실험실 규모에서의 회수 효율은 손실량이 불균형적으로 큰 이유로 파악하기가 어려운 반면, 표 4에 나타난 값들은 방비 처리 단계를 제외하고 무용매-추출 샘플에 대한 값이 헥산 추출 대조군에 대한 값과 동일하게 나타나는 경향을 보인다. 헥산 대조군에 대한 방비 처리 단계의 회수 효율은 다른 3 가지 샘플에서 관찰된 회수율보다 낮은데, 통계적 관점에서 보면 그 차이는 미미하다. 방비 처리단계의 높은 손실은 헥산 대조군에 대한 전반적인 회수 효율을 떨어뜨렸다. 낮은 수득율은 오일의 품질에 중요한 영향을 미치지는 않았다. 전반적으로, 여러 오일 샘플의 각 방법에 있어 나타난 차이는 미미하였다.

표 4

[0071] 오일 정제 단계로부터의 다양한 과정 분석결과

	HEX-1	SF1A	SF2A	SF3A
처리조건				
혼합농도	45.0%	52.9%	52.8%	45.0%
증기 살포율	3.4%	3.4%	2.5%	2.2%
회수 수율				
탈납	80.6%	92.3%	87.7%	85.5%
정제	89.4%	84.8%	91.8%	95.0%
물세척	90.6%	94.5%	95.8%	81.2%
표백	86.1%	89.2%	87.3%	84.1%
탈취	97.4%	96.1%	97.2%	97.5%
패키징	88.2%	89.7%	89.3%	95.8%
총계	**48.2%**	**56.9%**	**58.5%**	**51.8%**

[0072] 계속적인 3가지 무용매 추출 과정으로부터 완전히 정제된 샘플 및 헥산-추출 대조군에 대한 분석결과가 표 5에 나타나 있다. 또한 각각의 요소에 대하여 일치하는 결과가 나타나 있다.

[0073] 무용매 추출 과정의 초기 미정제 오일 샘플로부터 철 함유량에 대하여 분석하였다. 상기 샘플의 철 함유량은 0.08 ppm이었다. 그 밖의 미량 금속원소의 농도는 각각의 검출 제한 농도 이하였다.

표 5

[0074] 헥산 추출 오일과 비교하여 무용매 추출 방법을 이용한 RDB DHA 오일의 QC 결과

헥산		무용매 추출방법		
샘플 ID#	HEX-1	SF1A	SF2A	SF3A
과산화물 값(meq/kg)	0.28	0.69	0.35	0.34
산도(mgKOH/g)	0.17	0.11	0.57	0.24
수분 및 휘발성	0.00%	0.06%**	0.00%	0.00%
미량금속원소(ppm)				
납	<0.20	<0.20	<0.20	<0.20
비소	<0.20	<0.20	<0.20	<0.20
철	0.22	0.21	0.56***	0.02
구리	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
수은	<0.20	<0.20	<0.20	<0.20
DHA 함량(%FAME)	36.9	37.3	37.0	37.7
DHA 함량(mg/g)	342	345	343	351
헥산(ppm)	<3	<3	<3	<3

[0075] * 정제 및 표백단계를 반복하여 거치면서 수치는 0.22mg KOH/g로 감소됨.

[0076] ** 위 샘플은 샌디에고 발효 과학 분석팀에 의하여 분석된 것임.

[0077] *** 정제 및 표백단계를 반복하여 거치면서 수치는 0.22 ppm이하로 감소됨.

[0078] 표 6에는 헥산 대조군에 대하여 무용매 추출 과정으로부터 추출한 3가지 샘플의 보다 직접적인 평균 분석 결과가 나타나 있다.

표 6

[0079] 평균값의 비교

헥산		무용매 추출방법			
샘플 ID#	대조구	평균	표준편차	CV	%차이
과산화물 값(meq/kg)	0.28	0.46	0.20	43.3%	64.3%
산도(mgKOH/g)	0.17	0.19*	0.06	33.3%	11.2%
수분 및 휘발성	0.00%	0.02%	0.03%	173%	ND
미량금속원소(ppm)					
납	<0.20	<0.20	N/A	N/A	0.0%
비소	<0.20	<0.20	N/A	N/A	0.0%
철	0.22	0.26	0.27	104%	18.2%
구리	<0.05	<0.05	N/A	N/A	0.0%
수은	<0.20	<0.20	N/A	N/A	0.0%
DHA 함량(%FAME)	36.9	37.3	0.4%	0.9%	1.1%
DHA 함량(mg/g)	342	346	4	1.2%	1.2%
헥산(ppm)	<3	<3	N/A	N/A	0.0%

[0080] * 재수행된 샘플에 산도를 이용하여 산출한 수치임.

[0081] 상기 실험의 결과에서, 무용매 추출 과정이 재현 가능하고, 이로부터 추출된 지질은 방법 수행 및 생산 품질의 견지에서 헥산 추출 과정으로부터 수득된 지질과 차이가 없다는 것을 확인할 수 있다. 본 발명의 무용매 추출 방법으로부터의 최종 생산물은 지방산과 스테롤 분석결과에서도 나타났듯이, 통상의 헥산 사용을 기본으로 하는 추출 방법으로부터 생산된 지질과 실질적으로 동등하다.

[0082] 다양한 실시예에 있어, 본 발명은 여기에 전반적으로 기재되고 설명된 것처럼 구성요소, 방법, 과정, 시스템 및/또는 장치를 포함하고, 다양한 실시예, 이들의 부분 조합 및 부분 집합을 포함한다. 당업계의 숙련된 자는 본 발명의 상세한 설명으로부터 본 발명을 수행하고 사용하는 방법을 파악할 수 있다. 본 발명은 다양한 실시예에 있어, 이에 기술 및/또는 기재되지 않은 사항이 없을때의 장치 및 과정을 제공하는 것을 포함하고, 또는 다양한 실시예에 있어 기재되지 않은 사항이 없을때, 수행능력을 향상시키고, 쉽게 성과를 올리고, 그리고/또는 실행비용을 절감하기 위해 사용되는 이전의 장치 또는 방법을 포함한다.

[0083] 본 발명에서 이상으로 상술한 논의는 해설 및 설명의 목적으로 기술되었다. 상기의 내용은 본 발명의 범위를 제한하는 것이 아니다. 비록 본 발명의 기재내용이 하나 또는 그 이상의 실시예 및 특정한 변형 및 변경 사항을 포함한다고 하더라도, 본 발명의 명세서를 토대로 당업계의 통상의 지식 및 기술 범위내에서 일어날 수 있는 다른 변형 및 변경사항은 본 발명의 범위내에 포함된다. 본 발명은 상호 대치, 교환할 수 있고, 그리고/또는 등가의 구조, 기능, 범위 또는 단계들이 여기에 밝혀져 있는지의 여부와는 관계없이, 그리고 어떠한 특허 가능한 내용을 공개적으로 제공할 의도없이, 첨부된 청구항에 대하여 그것들을 상호 대치, 교환할 수 있고, 그리고/또는 이들과 등가의 구조, 기능, 범위 또는 단계들을 포함한 허용된 범위까지의 선택적인 실시 태양을 포함하는 권리를 얻을 수 있다.

도면

도면1

