



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0028823
(43) 공개일자 2013년03월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C10G 3/00 (2006.01) C10L 1/08 (2006.01)
B09B 3/00 (2006.01) B01D 11/02 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0091818
(22) 출원일자 2011년09월09일
심사청구일자 2011년09월09일

(71) 출원인
인하대학교 산학협력단
인천광역시 남구 인하로 100, 인하대학교 (용현동)
(72) 발명자
이철균
서울특별시 서초구 신반포로 270, 104동 801호 (반포동, 반포자이아파트)
성동호
서울특별시 영등포구 양평로30길 51, 102동 1605호 (양평동6가, 한솔아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김남식, 양기혁, 박기원, 한윤호, 이인행

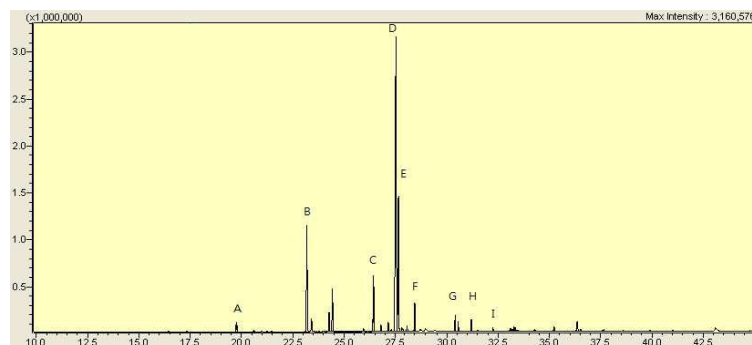
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 배양 동물세포 폐기물을 이용한 바이오디젤의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 배양 동물세포로부터 바이오디젤을 제조하는 방법에 관한 것으로서, 회수된 젖은 상태의 배양 동물세포 회수물에 클로로포름-메탄을 혼합용매, 이소프로필알콜 및 에탄올로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 극성 유기용매를 가한 후 교반하여 지질을 추출하는 1차 추출단계; 상등액과 세포침전물을 층분리하고, 상기 상등액을 회수하여 농축하고, 농축물에 메탄올을 추가한 후 증발시켜 조지질을 수득하는 조지질 수득단계; 상기 조지질에 황산/메탄올 용액을 가하여 가열환류한 후 노르말헥산, 노르말헥탄 및 이들의 혼합용매로 구성되는 군으로부터 선택되는 비극성 유기용매를 가하여 추출하는 2차 추출단계; 및 노르말헥산층을 회수하여 감압농축하여 바이오디젤을 회수하는 회수단계를 포함하는 배양 동물세포 회수물로부터 바이오디젤의 생산방법을 제공한다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

임상민

인천광역시 부평구 부평1동 동아2단지 아파트 21동
1103호

류영진

인천광역시 남구 인하로120번길 19-1, 2층 (용현동)

홍한마루

인천광역시 남구 인하로47번길 47, 507호 (용현동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 D11101311H310000110

부처명 국토해양부

연구사업명 해양에너지 전문인력 양성/해양에너지 특성화대학원 지원사업

연구과제명 해양에너지 전문인력 양성

주관기관 인하대학교 산학협력단

연구기간 2009.04.06 ~ 2014.02.28

특허청구의 범위

청구항 1

회수된 젖은 상태의 배양 동물세포 회수물에 극성 유기용매를 가한 후 교반하여 지질을 추출하는 1차 추출단계;
상등액과 세포침전물을 층분리한 후 상기 상등액을 농축하여 농축물을 제조하는 상등액 농축하는 조지질 수득단계;

상기 수득된 조지질에 산/알코올 용액을 가하여 가열환류한 후 비극성 유기용매로 추출하는 2차 추출단계; 및
비극성 유기용매층을 회수한 후 감압농축하여 바이오디젤을 분리하는 분리단계를 포함하는 배양 동물세포 회수물로부터 바이오디젤의 생산방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 동물세포는 CHO(Chinese hamster ovary) 세포, BHK(baby hamster kidney) 세포, HEK(human embryo kidney) 세포, NSO(myeloma cell line) 세포인, 배양 동물세포 회수물로부터 바이오디젤의 생산방법.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 동물세포는 CHO 세포인,

배양 동물세포 회수물로부터 바이오디젤의 생산방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 극성 유기용매는 메탄올, 에탄올, 이소프로필알콜, 아세톤 또는 메탄올/클로로포름 혼합용매인,

배양 동물세포 회수물로부터 바이오디젤의 생산방법.

청구항 5

상기 극성 유기용매는 배양 동물세포 회수물 부피 대비 1 내지 10배의 부피로 가해지는,

배양 동물세포 회수물로부터 바이오디젤의 생산방법.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 메탄올/클로로포름 혼합용액의 혼합비는 1:4 내지 4:1인,

배양 동물세포 회수물로부터 바이오디젤의 생산방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 2차 추출단계의 산/알코올 용액은 황산/메탄올 용액, 황산/에탄올 용액, 무수염산/메탄올 용액, 무수염산/에탄올 용액, 염화아세틸/메탄올 및 염화아세틸/에탄올 용액인,

배양 동물세포 회수물로부터 바이오디젤의 생산방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 2차 추출단계의 산/알코올 용액은 1 내지 5%(w/v) 농도인,

배양 동물세포 회수물로부터 바이오디젤의 생산방법.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 2차 추출단계의 산/알코올 용액은 상기 조지질 대비 0.2 내지 20배 부피(v/w)로 가해지는,

배양 동물세포 회수물로부터 바이오디젤의 생산방법.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 2차 추출단계에서 가열환류는 50 내지 75℃의 온도조건에서 2 내지 10시간 동안 수행되는,

배양 동물세포 회수물로부터 바이오디젤의 생산방법.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 비극성 유기용매는 노르말헥산, 노르말헵탄, 사이클로헥산, 디에틸에테르 또는 이들의 혼합용매인,

배양 동물세포 회수물로부터 바이오디젤의 생산방법.

청구항 12

제1항에 있어서,

상기 비극성 유기용매는 산/알코올 용액 대비 2 내지 20배 부피(v/v)로 가해지는,

배양 동물세포 회수물로부터 바이오디젤의 생산방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 바이오디젤의 제조방법에 관한 것으로서, 더 상세하게는 배양 동물세포 폐기물을 이용한 바이오디젤의 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 일반적으로, 중요한 지속생산 가능한 에너지의 하나인 바이오디젤은 지방산의 알킬에스터로서 지방산 글리세롤 에스터를 사용하여 제조하고 있으며 대부분의 지방산 글리세롤에스터는 식용으로 사용 가능한 기름으로서 인류 생존에 가장 중요한 식량자원이기 때문에 바이오디젤의 원료로 사용할 때 식량자원의 부족과 식량자원 가격의 급격한 상승을 유발할 수 있다.

[0003] 인류의 생산 활동 결과 발생하는 폐기물들은 환경을 파괴하는 주요 원인이기 때문에, 폐기물의 활용은 인류의 지속적 생존을 위하여 필요하다. 특히 이들 폐기물에서 에너지를 생산하여 다시 사용하는 기술은 상술한 식량자원을 이용한 바이오디젤 생산시 문제점을 해소하고 환경파괴를 방지할 수 있다는 점에서 주목 받고 있다.

[0004] 한편, CHO 세포와 같은 동물세포는 치료용 항체 등 고가의 의약품 생산에 많이 사용되고 있으며 생산제품의 품질이 우수하여 의약품 생산에 사용이 점점 증가하는 단백질 생산원이나 단백질 생산 후 폐기물로 남는 대량의 동물세포 폐기물은 유기물의 함량이 높아 폐기 시에 생물학적 산소 요구량을 급격히 상승시키고, 폐기를 위해 소각처리를 할 경우에는 많은 에너지를 소모하기 때문에, 처리 시 주의를 요하는 폐기물로서 현재 고비용의 폐기물 처리공정을 통하여 폐기되고 있다. 따라서, 단백질 생산에 사용하고 남은 세포 폐기물을 재활용할 수 있는 방법의 개발이 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0005] 그러나, 배양 동물세포 폐기물은 젖은 상태로 회수되는 생세포로서 지질, 탄수화물, 단백질, 핵산, 기타 미량원소 및 다량의 물로 구성되어 세포 구성성분 자체의 이용을 통하여 재활용이 가능할 것으로 여겨지나 세포성분의 효과적인 분리방법과 이용방법의 개발이 이루어지지 않아 재활용이 되지 않고 전량 폐기되고 있는 실정이다.
- [0006] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 포함하여 여러 문제점들을 해결하기 위한 것으로서, 배양 동물세포 폐기물을 이용하여 바이오디젤을 제조하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다. 그러나 이러한 과제는 예시적인 것으로, 이에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

과제의 해결 수단

- [0007] 본 발명의 일 관점에 따르면, 회수된 젖은 상태의 배양 동물세포 회수물에 극성 유기용매를 가한 후 교반하여 지질을 추출하는 1차 추출단계; 상등액과 세포침전물을 층분리한 후 상기 상등액을 농축하여 농축물을 제조하는 상등액 농축하는 조지질 수득단계; 상기 수득된 조지질에 산/알코올 용액을 가하여 가열환류한 후 비극성 유기용매로 추출하는 2차 추출단계; 및 비극성 유기용매층을 회수한 후 감압농축하여 바이오디젤을 분리하는 분리단계를 포함하는 배양 동물세포 회수물로부터 바이오디젤의 생산방법이 제공된다.
- [0008] 이 때, 상기 배양 동물세포는 CHO(Chinese hamster ovary) 세포, BHK(baby hamster kidney) 세포, HEK(human embryo kidney) 세포, NS0(myeloma cell line) 세포가 사용될 수 있고, 바람직하게는 CHO 세포가 사용될 수 있다.
- [0009] 상기 극성 유기용매는 클로로포름-메탄올 혼합용매, 이소프로필알콜, 에탄올, 메탄올 또는 아세톤일 수 있다.
- [0010] 상기 극성 유기용매는 배양 동물세포 회수물 부피 대비 1 내지 10배의 부피로 가할 수 있고, 더 바람직하게는 4 내지 7배로 가할 수 있다. 상기 극성 유기용매 중 메탄올/클로로포름 혼합용액의 혼합비는 1:4 내지 4:1일 수 있고, 바람직하게는 1:1 내지 3:1일 수 있다.
- [0011] 상기 조지질 수득단계에서 사용되는 극성 유기용매는 메탄올 또는 에탄올일 수 있으며, 상기 농축물 대비 1 내지 10배의 부피로 가할 수 있다.
- [0012] 상기 2차 추출단계의 산/알코올 용액은 황산/메탄올 용액, 황산/에탄올 용액, 무수염산/메탄올, 무수염산/에탄올, 염화아세틸/메탄올 및 염화아세틸/에탄올 일 수 있고, 농도는 1 내지 5%(w/v)일 수 있고, 상기 조지질 대비 0.2 내지 20배 부피(v/w)로 가할 수 있다. 상기 2차 추출단계에서 가열환류는 50 내지 75℃의 온도조건에서 수행될 수 있고, 2시간 내지 10시간 바람직하게는 5시간 내지 8시간 동안 수행될 수 있다. 상기 2차 추출단계에서 비극성 유기용매는 노르말헥산, 노르말헵탄, 사이클로헥산, 디에틸에테르 또는 이들 중 적어도 둘 이상의 혼합용매일 수 있고, 상기 산/알코올 용액 대비 2 내지 20배 부피(v/v)로 가할 수 있다.
- [0013] 상기 방법에 의해 바이오디젤을 생산하고 발생하는 배양 동물세포 침전물은 건조 후 퇴비화가 용이한 건조유기물이 될 수 있다.
- [0014] 일반적으로 지질을 추출할 때 원료물질을 건조된 상태로 사용하나 배양 후 정제과정에서 회수한 배양 동물세포 폐기물은 젖은 점성 액상스프 상태로 회수가 되며 건조를 위해서는 동결건조, 분무건조 등 에너지를 다량 소모하는 공정이 필요하다. 이에 본 발명자들은 지질은 유기용매에 전이되는 특징을 이용하여 유기용매를 사용하여 젖은 상태의 동물세포 폐기물에서 직접 지질을 추출하는 방법을 개발하고자 시도하였으며 추출 방법을 면밀하게 연구한 결과 배양된 동물세포 회수물에 유기용매를 직접 가하여 지질을 추출할 때 유기용매의 종류에 따라 지질을 추출할 수 있음을 확인하였다. 회수된 젖은 상태의 배양 동물세포 폐기물은 통상적으로 80 ~ 85%의 수분을 함유하고 있으며 젖은 상태의 배양 동물세포 폐기물에 유기용매를 직접 가해 교반 추출할 때 사용하는 유기용매의 종류에 따라 세포를 분말형태로 만들며 지질을 높은 수율로 추출할 수 있음을 확인하였다.
- [0015] 클로로포름-메탄올 혼합용매, 이소프로필알콜, 에탄올, 메탄올 및 아세톤과 같은 극성 유기용매를 젖은 동물세포 부피의 1배 내지 10배의 부피를 가하여 추출하였을 때 젤을 형성 시키지도 않고 지질도 높은 수율로 추출되며 남은 잔사도 쉽게 고형성분으로 만들 수 있어 추출된 조지질을 바이오 디젤 제조용 원료로 사용가능하며 남은 잔사도 건조가 용이한 상태로 회수하여 2차 활용에 이용할 수 있다. 추출된 조지질은 일반적인 바이오디젤 전환 방법인 염기/메탄올 용매 하에서 가열할 때 부반응인 비누화 반응으로 다량 진행되어 바이오 디젤로 제조가 어려우며 산촉매인 황산/메탄올 방법을 사용할 때도 통상적인 방법인 0.2배 부피의 메탄올을 사용할 때 지방산으로 분해되어 극히 일부분만이 바이오디젤로 전환됨을 확인하였으며, 이를 극복하기 위해, 10배 이상의 부피

의 황산/메탄올을 사용하여 가열 환류반응을 10시간 이내 수행하고, 노르말렉산, 노르말헵탄, 사이클로헥산, 디에틸에테르 또는 이들 중 어느 둘 이상의 혼합용매와 같은 추출 후 용매의 증발제거가 유리한 저온 휘발성을 갖는 비극성 유기용매로 추출하였을 때 효과적으로 바이오디젤로 전환시킬 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다(도 1 및 2 참조).

발명의 효과

[0016] 상기한 바와 같이 이루어진 본 발명의 일실시예에 따르면, 지금까지 폐기되어 오던 동물세포 폐기물로부터 재생 가능한 에너지인 바이오디젤을 생산할 수가 있어 별도의 폐기물 처리 공정 없이 바이오디젤을 생산함으로써, 환경개선 및 에너지 획득의 효과를 얻을 수 있고, 바이오디젤을 제조하고 남은 탈지 동물세포 침전물도 건조가 용이하여 보관 및 이송이 편리한 건조분말로 만들어 재사용의 편의성을 높여서 퇴비 등으로 재활용함으로써 폐기시 발생하는 환경오염을 막고 재사용에 따른 경제적인 효과를 거둘 수 있다. 물론 이러한 효과에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 본 발명의 일실시예에 따른 방법을 이용하여 CHO 세포 폐기물로부터 제조된 바이오디젤이 담긴 시험관을 촬영한 사진이다.

도 2는 본 발명의 일실시예에 따른 방법을 이용하여 CHO 세포 폐기물로부터 제조한 바이오디젤의 가스크로마토그램이다:

A: 미리스트산; B: 팔미트산; C: 스테아르산;

D: 올레산; E: 10-옥타데칸산 F: 노나데칸산(내부 표준물질);

G: 리놀레인산; H: 리놀렌산; 및 I: 아라키돈산.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.

[0019] 실시예 1: 젖은 CHO 세포 폐기물의 제조

[0020] 무혈청 배지 ProCHO5(Lonza사, 12-766Q)를 사용하여 동물세포 배양기에서 CHO 세포를 배양하였다. 구체적으로, ProCHO5에 4 mM 글루타민을 첨가하여 만든 배지를 무균 여과하여 3 L Applikon 연속교반형 세포배양기에 1 L(working volume)를 주입한 다음 125 ml 삼각플라스크에서 ProCHO5에 4 mM 글루타민을 첨가하여 만든 배지를 사용하여 5% CO₂, 37℃ 조건에서 3일간 배양한 CHO DUKX-B11 세포를 20 ml 플라스크 6개에서 종배양한 세포를 접종하여 배양기내에서 3×10⁵ cell/ml의 세포 농도에서 배양을 시작하였으며 100 rpm, DO 40%, 37℃에서 8일간 종배양 세포를 배양하였다. 그 결과 최대세포농도는 배양 4일차에 3.76×10⁶ cells/ml의 농도에 이르렀다.

[0021] ProCHO5에 4 mM 글루타민을 첨가하여 만든 배지를 무균 여과하여 20 L 연속교반형 세포배양기에 14 L를 주입한 다음 종배양 CHO DUKX-B11 세포를 1 L 접종하고 100 rpm, DO 40%, 37℃에서 8일간 배양하였다.

[0022] 이어, 배양액을 1500 rpm에서 3분간 원심분리하여 점성 액상상태의 젖은 CHO 세포 폐기물 320 ml를 수득하였다.

[0023] 실시예 2: 지질의 추출과 탈지 CHO 세포의 제조

[0024] 각각 20 ml의 CHO 세포 폐기물에 100 ml의 노르말렉산, 클로로포름, 아세톤, 메탄올, 에탄올, 이소프로필알콜, 메탄올/클로로포름 2:1 혼합용매를 넣고 실온에서 하룻밤 동안 마그네틱 교반기를 사용하여 교반하여 지질을 추출한 다음 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액과 세포잔사를 분리하였다. 상등액과 세포침전물을 분리하고 상등액은 감압회전 증발장치를 사용하여 50℃ 수욕에서 농축한 다음 농축잔사 1 내지 2 g에 20 ml 메탄올을 추가하여 다시 증발시켜 조지질을 수득하였고, 세포잔사는 열풍건조기를 사용하여 40℃에서 하룻밤 건조하여 건조 CHO 세포 잔사를 수득하였다(표 1).

표 1

[0025]

추출 유기용매에 따른 조지질과 건조 CHO 세포 잔사 수득량

유기용매	조지질(g)	탈지건조 CHO 세포 (g)	탈지건조 CHO 세포 상태
메탄올/클로로포름 2:1(v/v)	0.87	2.69	분말
이소프로필알콜	0.80	2.84	분말 + 덩어리
에탄올	0.87	2.88	덩어리고체
메탄올	0.74	2.65	덩어리고체
아세톤	0.60	3.07	덩어리고체
클로로포름	ND	ND	ND
노르말헥산	ND	ND	ND
ND: 측정 불가			

[0026]

그 결과, 메탄올/클로로포름 혼합용매, 이소프로필알콜, 에탄올, 메탄올, 아세톤과 같은 극성 유기용매를 사용한 경우에는 조지질이 분리되었고, 지질성분이 제거된 탈지 CHO 세포를 분리할 수 있었다. 반면, 비극성 유기용매인 클로로포름 또는 노르말헥산으로 추출하였을 때는 에멀전화 현상이 심화되어 상등액이 분리되지 않아 원심 분리하여 추출용매의 일부인 20 ml만 분리 농축하여 바이오디젤 전환 반응에 사용하였다.

[0027]

실시예 3: 바이오 디젤의 전환

[0028]

실시예 2에서 추출한 각각의 조지질에 10배 부피(v/w)의 3%(W/v) 황산/메탄올 용액을 넣고 밀봉상태에서 65℃에서 5시간 가열 반응한 다음 사용한 3%(W/v) 황산/메탄올 용액의 10배 부피의 0.3 mg 나프탈렌/노르말 헤파탄용액을 가하여 1분간 볼텍스믹서로 강하게 교반한 다음 상층을 취하여서 가스크로마토그래피로 분석하여 생성된 지방산메틸의 양을 구하였다(표 2). 나프탈렌은 가스크로마토그래피 분석시 내부표준이고, 노르말헤파탄은 용매로 사용하였다.

표 2

[0029]

추출용매에 따른 바이오디젤의 생산량

유기용매	지방산메틸 (바이오디젤)의 생성량(g)	건조세포당 바이오디젤 전환량(%)
메탄올/클로로포름 2:1(v/v)	0.26	7.2
이소프로필알콜	0.16	4.4
에탄올	0.14	3.9
메탄올	0.09	2.5
아세톤	0.10	2.8
클로로포름	0.04 ^{1*}	1.3
노르말헥산	0.01 ^{2*}	0.3
^{1*} , ^{2*} : 추출액을 20 ml만 분리하여 농축 반응 후 정량한 값에 5배		

[0030]

[0031]

그 결과, 메탄올/클로로포름 혼합용매, 이소프로필알콜 및 에탄올의 경우 지방산메틸의 생성량이 높았고, 건조 세포당 바이오디젤 전환량도 우수함을 알 수 있었다. 메탄올과 아세톤의 경우에도 상기 세 종류의 극성 유기용매보다는 수율이 약간 떨어졌으나, 지방산메틸이 생성되었다. 반면, 조지질의 추출에 실패한 비극성 유기용매인 클로로포름과 노르말헥산의 경우에는 지방산메틸의 생성량이 극히 저조함을 알 수 있었다.

[0032]

지방산메틸의 함량은 하기 실험예에 기재된 방법을 통해 계산하였다.

[0033]

실험예 1: 바이오 디젤의 함량 분석

[0034]

영린 M600D 가스크로마토그래피 기기를 사용하여 5% 페닐폴리디메틸실록산이 교차연결된(DH-5HT) 충전제가 0.1 μm 두께로 코팅된 0.32 mm 내경의 15 m 모세관 컬럼을 사용하였으며 오븐온도는 50℃에서 1분 180℃까지 분당

15℃씩 상승 후 다음 230℃까지 분당 7℃로 상승시킨 후 380℃까지 분당 30℃로 상승시킨 다음 380℃에서 10분간 유지하여 분석하였다. 이동상으로 헬륨가스를 분당 3 ml씩 흘렸으며 주입구 온도는 300℃, 검출기는 불꽃이온화검출기(FID)를 사용하여 380℃를 사용하였으며 샘플은 1 μl를 주입하였다.

내부 표준물질로 나프탈렌을 0.3 mg/ml로 노르말헥산에 용해하여 사용하였고 대조 표준물질로 대두유로 자가 제조한 바이오디젤 (순도 99.5% KS M 2413 방법)을 사용하였으며 내부 표준물질인 나프탈렌 피크의 면적과 바이오디젤의 검출 시간대인 7분에서 12분 사이의 피크의 면적 합으로 바이오디젤의 양을 정량하였으며 정량에 사용한 계산식은 아래와 같다.

$$\text{바이오디젤 량(g)} = \frac{[\Sigma A]_{\text{sample}} / A_{\text{Istd}}}{[\Sigma A]_{\text{std}} / A_{\text{Istd}}} \times (m_{\text{std}} / V_{\text{std}}) \times 0.995 \times V_{\text{sample}}$$

[ΣA]_{std}: 대조표준 대두유 바이오디젤 분석시 RT7에서 RT12까지 피크의 총면적

A_{Istd}: 대조표준 대두유 바이오디젤 분석시 내부 표준물질 피크의 면적

m_{std}: 대조 표준 대두유 바이오디젤의 취한 시료무게(g)

V_{std}: 대조 표준 대두유 바이오디젤 용해한 나프탈렌용액의 부피(ml)

[ΣA]_{sample}: 분석 샘플의 RT7에서 RT12까지 피크의 총면적

A_{Istd}: 분석 샘플의 나프탈렌(내부표준)의 면적

V_{sample}: 분석 샘플의 추출한 노르말헥산 부피(ml)

실시예 4: 젖은 CHO 세포 폐기물로부터 바이오디젤의 제조

150 ml의 젖은 CHO 세포 폐기물에 750 ml의 메탄올/클로로포름=2:1(v/v) 용액을 가한 후 하룻밤 실온에서 마그네틱 교반기로 교반한 다음 1500 rpm으로 10분간 원심분리한 후 상등액을 수득하였다. 한편, 침전된 세포 잔사에 100 ml의 메탄올/클로로포름=2:1(v/v) 용액을 가하여 재현탁시킨 후 1500 rpm 10분간 원심분리하여 상등액을 수득하여 상기에서 수득한 상등액과 합하여 감압 하에서 50℃ 수욕으로 가열하며 농축하였다. 농축잔사에 100 ml 메탄올을 가하여 현탁시킨 후 다시 감압농축하여 조지방 6.7g을 수득하였다. 상기에서 상등액을 분리하고 남은 침전물을 모아서 40℃ 열풍건조기에서 하룻밤 건조하여 탈지 CHO 세포 분말 20.2g을 수득하였다.

수득한 조지방 6.7 g에 67 ml의 3% 황산/메탄올 용액을 가하고 가열환류하며 5시간 반응을 한 다음 670 ml 노르말헥산을 사용하여 2회 추출하고 노르말헥산층을 모아 300 ml 정제수로 세척한 다음 감압 농축하여 농축잔사를 1 ml 증류수로 세척한 후 1 mmHg 고진공 조건에서 감압농축하여 연한노란색을 띤 투명액상의 바이오디젤 1.4 g을 수득하였다(도 1).

수득한 바이오디젤을 구성하는 지방산의 비는 GC-MS 분석결과(도 2) 표 3과 같았으며 구름점은 8℃이었다.

표 3

CHO 세포 유래 바이오디젤의 지방산 분포

지방산 메틸에스터	백분율(%)	상대분포	비고
미리스트산	1.36	0.09	포화지방산
팔미트산	14.58	1	포화지방산
7-헥사데칸산	2.20	0.15	불포화지방산
팔리톨레산	5.67	0.39	불포화지방산
스테아르산	7.17	0.49	포화지방산
엘라이드산	0.98	0.07	불포화지방산
올레산	50.42	3.45	불포화지방산
10-옥타데칸산	16.60	1.13	불포화지방산
리놀레인산	0.48	0.03	불포화지방산
리놀렌산	0.41	0.03	불포화지방산
아라키돈산	0.13	0.01	포화지방산

총계	100		
포화지방산	23.24	1.59	
단일불포화지방산	75.86	5.187	
다중불포화지방산	0.89	0.061	

[0049] 상기 표 3에서 나타나는 바와 같이, CHO 세포에서 추출한 바이오디젤은 올레산 함량이 50%를 초과하는 등, 불포화지방산의 함량이 75%를 초과하고, 구름점이 비교적 낮아, 운송용 내연기관을 위한 연료로 적합함을 알 수 있다.

[0050] 상술한 지방산 메틸에스터 함량은 하기 실험예에 따라 분석하였다.

[0051] **실험예 2: 지방산 조성분포 실험**

[0052] 동일 SIMADZU GC-MS-QP2010 Plus 기기를 사용하여 비스시아노프로필 폴리실록센(biscyanopropyl polysiloxane) 충전제가 0.2 μm 두께로 코팅된 0.25 mm 내경의 100 m 모세관 컬럼(Rt®-2560)을 사용하였으며 오븐온도는 140℃에서 5분 240℃까지 분당 4℃씩 상승 후 240℃에서 15분간 유지하여 분석하였다. 이동상으로 헬륨가스를 분당 3 ml씩 흘렸으며 주입구 온도는 250℃, 검출기는 질량분석기(Mass spectrometer)를 사용하여 250℃에서 검출 전압은 1.5 kV를 사용하였고 샘플은 1 μl를 주입하였다.

[0053] 내부표준 물질로 탄소 수 19개의 메틸에스터(C19:0, nonadecanoic acid)을 0.4 mg/ml로 노르말헵탄에 용해하여 사용하였고 피크상의 면적으로 내부표준물질의 농도와 지방산 메틸에스터의 농도를 비교하여 정량 하였다. 정량에 사용한 계산식은 아래와 같다.

[0054] 각각의 지방산 *Methyl Ester* 함량(%) =
$$\frac{A_p}{[\Sigma A] - A_{IS}} \times 100\%$$

[0055] ΣA: 지방산 메틸에스터 피크의 총면적

[0056] A_{IS}: Nonadecanoic acid(내부 표준물질)의 면적

[0057] A_p: 각 지방산 Methyl Ester의 피크면적

[0058] 본 발명은 상술한 실시예 및 실험예를 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

