(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0028336
(43) 공개일자 2013년03월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 5/00 (2006.01) *C12N 1/12* (2006.01)
C12P 7/64 (2006.01) *C10G 3/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0091817
(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

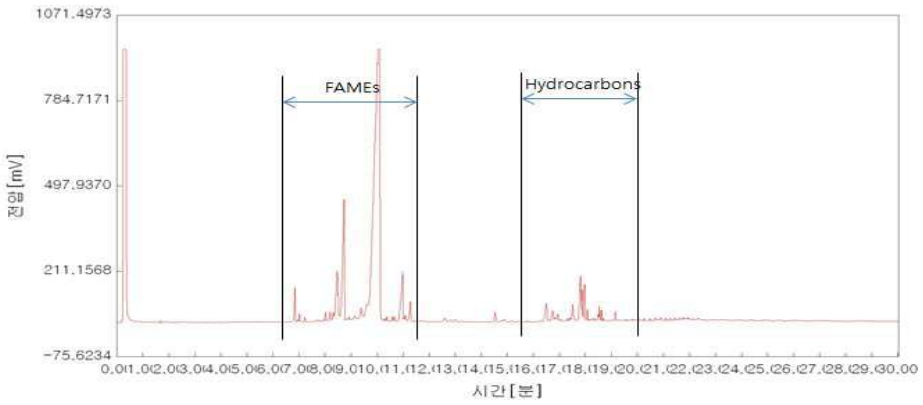
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 **재생 가능한 바이오에너지의 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 미세조류로부터 다양한 종류의 바이오에너지를 순차적으로 생산하는 생산방법에 관한 것으로서, 배양 후 회수한 미세조류 균체를 건조하는 건조단계; 상기 건조된 균체를 파쇄하지 않고 추출용매로 추출하여, 고상-액상으로 분리하는 추출단계; 및 분리된 액상으로부터 긴사슬 탄화수소를 회수하는 회수단계를 포함하는 미세조류 균체로부터 긴사슬 탄화수소의 생산방법을 제공한다.

대 표 도 - 도1



(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

배양후 회수한 미세조류 균체를 건조하는 건조단계;

상기 건조된 균체를 파쇄하지 않고 추출용매로 추출하여, 고상-액상으로 분리하는 추출단계; 및

분리된 액상으로부터 긴사슬 탄화수소를 회수하는 회수단계를 포함하는 미세조류 균체로부터 긴사슬 탄화수소의 생산방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 미세조류는 탄화수소를 세포 외부로 분비하여 표면에 축적하는 탄화수소 외부축적 미세조류인,

미세조류 균체로부터 긴사슬 탄화수소의 생산방법.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 탄화수소 외부축적 미세조류는 보트리오코커스 브라우니(*Botryococcus braunii*), 오란티오키트리움(*Aurantiochytrium* sp.) 또는 노스톡 무스코룸(*Nostoc muscorum*)인,

미세조류 균체로부터 긴사슬 탄화수소의 생산방법.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 보트리오코커스 브라우니(*Botryococcus braunii*)는 보트리오코커스 브라우니(*Botryococcus braunii*) LB572인,

미세조류 균체로부터 긴사슬 탄화수소의 생산방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 건조단계는 동결건조, 분무건조 또는 열풍건조에 의해 수행되는,

미세조류 균체로부터 긴사슬 탄화수소의 생산방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 추출용매는 저온 휘발 온도 특성을 갖는 비극성 유기용매인,

미세조류 균체로부터 긴사슬 탄화수소의 생산방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 저온 휘발 온도 특성을 갖는 비극성 유기용매는 노르말헥산, 노르말헵탄, 사이클로헥산, 디에틸에테르 또는 이들 중 둘 이상의 혼합용매인,

미세조류 균체로부터 긴사슬 탄화수소의 생산방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 추출단계의 추출 온도는 0 내지 40℃인,

미세조류 균체로부터 긴사슬 탄화수소의 생산방법.

청구항 9

배양후 회수한 미세조류 균체를 건조하는 건조 단계;

상기 건조된 균체를 파쇄하지 않고 1차 추출용매로 추출하여, 고상-액상으로 분리하는 1차 추출단계;

분리된 고상을 2차 추출용매로 추출한 후 층분리를 하는 2차 추출단계; 및

분리된 상층으로부터 용매를 휘발시켜 글리세롤에스터를 회수하는 회수단계를 포함하는 미세조류 균체로부터 지방산 글리세롤에스터의 생산방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 1차 추출용매는 저온 휘발 온도 특성을 갖는 비극성 유기용매인,

미세조류 균체로부터 지방산 글리세롤에스터의 생산방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 저온 휘발 온도 특성을 갖는 비극성 유기용매는 노르말헥산, 노르말헵탄, 사이클로헥산, 디에틸에테르 또는 이들 중 둘 이상의 혼합용매인,

미세조류 균체로부터 지방산 글리세롤에스터의 생산방법.

청구항 12

제9항에 있어서,

상기 2차 추출용매는 클로로포름/메탄올 혼합용매인,

미세조류 균체로부터 지방산 글리세롤에스터의 생산방법.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 클로포름/메탄올 혼합용매는 부피비가 1:4 내지 4:1인,

미세조류 균체로부터 지방산 글리세롤에스터의 생산방법.

청구항 14

배양후 회수한 미세조류 균체를 건조하는 건조 단계;

상기 건조된 균체를 파쇄하지 않고 1차 추출용매로 추출하여, 고상-액상으로 분리하는 1차 추출단계;

분리된 고상을 2차 추출용매로 추출한 후 층분리를 하는 2차 추출단계;

분리된 상층으로부터 용매를 휘발시켜 지방산 글리세롤에스터를 회수하는 회수단계;

상기 지방산 글리세롤에스터에 메탄올을 가하여 혼합하여 혼합액을 생성하는 혼합단계; 및

상기 혼합액을 가열환류시킨 후 3차 추출용매로 추출하는 3차 추출단계를 포함하는 바이오디젤 제조방법.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 1차 추출용매는 저온 휘발 온도 특성을 갖는 비극성 유기용매인,

바이오디젤 제조방법.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 저온 휘발 온도 특성을 갖는 비극성 유기용매는 노르말헥산, 노르말헵탄, 사이클로헥산, 디에틸에테르 또는 이들 중 둘 이상의 혼합용매인,

바이오디젤 제조방법.

청구항 17

제14항에 있어서,

상기 2차 추출용매는 클로로포름/메탄올 혼합용매인,

바이오디젤 제조방법.

청구항 18

제14항에 있어서,

상기 클로로포름/메탄올 혼합용매는 부피비가 1:4 내지 4:1인,

바이오디젤 제조방법.

청구항 19

제14항에 있어서,

상기 3차 추출용매는 저온 휘발 온도 특성을 갖는 비극성 유기용매인,

바이오디젤 제조방법.

청구항 20

제19항에 있어서,

상기 저온 휘발 온도 특성을 갖는 비극성 유기용매는 노르말헥산, 노르말헵탄, 사이클로헥산, 디에틸에테르 또는 이들 중 둘 이상의 혼합용매인,

바이오디젤 제조방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 에너지 및 이의 제조방법에 관한 것으로서, 더 상세하게는 재생 가능한 에너지 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[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 식량의 고갈을 유발할 수 있다.

[0003] 따라서 이에 대한 대안으로 미세조류가 각광받고 있는데, 미세조류는 이산화탄소, 물과 빛 에너지를 사용하여 유기물을 생합성하여 살아가며 현미경으로 볼 수 있는 작은 독립영양생명체로서 다량의 지질을 빠른 속도로 생합성하여 경제적으로 재생 가능한 에너지의 원료를 생산하므로 미세조류가 인류의 에너지위기를 극복할 수 있는 수단 중 한 가지로 여겨지고 있다. 특히, 보트리오코커스 브라우니(*Botryococcus braunii*)는 탄화수소를 생산하는 것으로 유명한 미세조류로서 그 생산하는 탄화수소의 종류에 따라 구분되며 보트리오코커스 브라우니 LB 572(UTEX, The Culture Collection of Algae at The University of Texas at Austin)는 이중결합 2개와 3개의

직쇄상 탄화수소인 알카디엔과 알카트리엔을 생산하는 품종 A (race A)에 속하며, 보트리오콕센이라 불리는 폴리메틸레이티드 불포화 트리테르펜 탄화수소를 만드는 품종 B (race B), 테트라테르펜류인 라이코파디엔을 생산하는 품종 L (race L)로 구분되고 있으며 생산하는 탄화수소를 에너지원으로 이용하려는 연구가 진행되어 왔다.

[0004] 이와 관련하여 대한민국 공개특허 제2011-0000963호 (미세조류로부터 탄화수소를 추출하는 장치 및 방법)는 알칸을 사용한 배양 중 추출 방법을 개시하고 있고, Frenz 등(Enzyme and Microbial Technology 11: 717-724, 1989)은 보트리오코커스 브라우니로부터 노르말헥산을 사용한 탄화수소를 회수하는 방법을 발표하였다. 그러나 보트리오코커스 브라우니는 탄화수소 뿐 아니라 지방산의 트리글리세리드로 대표되는 지방산 화합물도 생산하는 미세조류로서 탄화수소는 휘발유나 항공유의 제조원료로 사용되며 지방산 화합물은 바이오디젤의 제조원료가 되므로 탄화수소와 지방산화합물을 각각 분리하여 생산하는 기술이 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 그러나 이러한 종래의 방법들은, 보트리오코커스로부터 긴사슬 탄화수소와 지방산 글리세롤에스터를 구분하여 선택적으로 분리하여 추출하는 것이 불가능할 뿐만 아니라 탄화수소의 70% 정도만 추출되는 등 추출효율이 낮은 문제점을 가지고 있다.

[0006] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 포함하여 여러 문제점들을 해결하기 위한 것으로서, 보트리오코커스 브라우니로부터 긴사슬 탄화수소와 지방산 글리세롤에스터를 포함한 지방산화합물을 각각 분리하여 생산하는 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, 배양 후 회수한 미세조류 균체를 건조하는 건조단계; 상기 건조된 균체를 파쇄하지 않고 추출용매로 추출하여, 고상-액상으로 분리하는 추출단계; 및 분리된 액상으로부터 긴사슬 탄화수소를 회수하는 회수단계를 포함하는 미세조류 균체로부터 긴사슬 탄화수소의 생산방법이 제공된다.

[0008] 상기 긴사슬 탄화수소는 탄소수 16 내지 50을 갖는 직쇄상, 분지쇄상 또는 환구조를 갖는 탄화수소일 수 있고, 더 바람직하게는 탄소수 25 내지 40을 갖는 직쇄상, 분지쇄상 또는 환구조를 갖는 탄화수소일 수 있다.

[0009] 상기 미세조류는 탄화수소를 세포 외부로 분비하여 표면에 축적하는 탄화수소 외부축적 미세조류일 수 있으며, 상기 탄화수소 외부축적 미세조류는 보트리오코커스 브라우니(*Botryococcus braunii*), 오란티오키트리움(*Aurantiochytrium* sp.) 또는 노스톡 무스코룸(*Nostoc muscorum*)일 수 있고, 긴사슬 탄화수소의 생산성이 우수한 보트리오코커스 브라우니(*Botryococcus braunii*) LB572 균주일 수 있다.

[0010] 이 때, 상기 건조단계는 동결건조, 분무건조 또는 열풍건조에 의해 수행될 수 있고, 동결건조에 의해 수행되는 것이 더 바람직할 수 있다.

[0011] 상기 추출단계에서 건조된 균체는 파쇄하지 않은 상태로 사용되는데, 세포를 사전에 파쇄하면 긴사슬 탄화수소와 지방산 글리세롤에스터를 구분하여 추출하는 선택성이 사라지므로 파쇄하지 않은 건조한 세포를 사용하는 것이 바람직하다. 상기 추출용매는 추출효율이 우수해야 하고, 추출되는 물질을 변성시키지 않아야 하며, 사용 후 쉽게 회수하여 재사용하기 위해, 비교적 낮은 휘발 온도 특성을 갖추는 것이 바람직하고, 노르말헥산, 노르말헵탄, 사이클로헥산, 디에틸에테르 또는 이들 중 둘 이상의 혼합용매를 사용할 수 있다.

[0012] 상기 추출단계의 추출 온도는 0 내지 40℃일 수 있고, 상온일 수 있으며, 15 내지 25℃일 수 있다.

[0013] 상기 방법으로 보트리오코커스 브라우니 LB 572로부터 긴사슬 탄화수소를 선택적으로 추출하고 남은 균체로부터 2차 추출을 통하여 지방산 글리세롤에스터를 추출할 수 있다.

[0014] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 배양 후 회수한 미세조류 균체를 건조하는 건조 단계; 상기 건조된 균체를 파쇄하지 않고 1차 추출용매로 추출하여, 고상-액상으로 분리하는 1차 추출단계; 분리된 고상을 2차 추출용매로 추출한 후 층분리를 하는 2차 추출단계; 및 분리된 상층으로부터 용매를 휘발시켜 글리세롤에스터를 회수하는 회수 단계를 포함하는 미세조류 균체로부터 지방산 글리세롤에스터의 생산방법이 제공된다.

[0015] 상기 방법에 있어서, 상기 미세조류는 탄화수소를 세포 외부로 분비하여 표면에 축적하는 탄화수소 외부축적 미세조류일 수 있으며, 상기 탄화수소 외부축적 미세조류는 보트리오코커스 브라우니(*Botryococcus braunii*), 오란티오키트리움(*Aurantiochytrium* sp.) 또는 노스톡 무스코룸(*Nostoc muscorum*)일 수 있고, 긴사슬 탄화수소의 생산성이 우수한 보트리오코커스 브라우니(*Botryococcus braunii*) LB572 균주일 수 있다.

[0016] 상기 방법에 있어서, 상기 건조단계는 동결건조, 분무건조 또는 열풍건조에 의해 수행될 수 있고, 동결건조에 의해 수행되는 것이 더 바람직할 수 있다.

[0017] 상기 1차 추출단계에서 건조된 균체는 파쇄되지 않은 균주일 수 있다. 세포를 사전에 파쇄하면 긴사슬 탄화수소와 지방산 글리세롤에스터를 구분하여 추출하는 선택성이 사라지므로 파쇄하지 않은 건조한 세포를 사용하는 것이 바람직하다. 상기 1차 추출용매는 추출효율이 우수해야 하고, 추출되는 물질을 변성시키지 않아야 하며, 사용 후 쉽게 회수하여 재사용하기 위해, 비교적 낮은 휘발 온도 특성을 갖는 비극성 유기용매 것이 바람직하며, 상기 낮은 휘발 온도 특성을 갖는 비극성 유기용매는 노르말헥산, 노르말헵탄, 사이클로헥산, 디에틸에테르 또는 이들 중 둘 이상의 혼합용매일 수 있다.

[0018] 상기 1차 추출단계의 추출 온도는 0 내지 40℃일 수 있고, 상온일 수 있으며, 15 내지 25℃일 수 있다.

[0019] 상기 2차 추출용매는 클로로포름/메탄올 혼합용매일 수 있으며, 상기 클로로포름/메탄올 혼합용매는 부피비가 1:4 내지 4:1일 수 있고, 더 바람직하게는 1:2일 수 있다. 클로로포름의 경우 지방의 용해도를 높이고 메탄올은 추출용매의 세포벽 통과를 용이하게 함으로써 혼합용매가 단일 용매보다 지방산글리세롤의 추출효율을 높이는 것으로 추정된다.

[0020] 본 발명자들은 상기 방법으로 보트리오코커스 브라우니 LB 572로부터 긴사슬 탄화수소와 바이오디젤로 사용가능한 지방산 글리세롤에스터를 순차적으로 분리하였다. 1차 추출과정에서 선택적으로 추출된 긴사슬 탄화수소는 그람당 10,190 칼로리 이상의 우수한 연료특성을 가졌고, 녹는점이 27 내지 33℃로 비교적 낮아 발전기, 보일러 등의 연소용 연료로서 직접 사용가능하고, 열분해 시 휘발유나 항공유를 제조할 수 있는 우수한 제조원료가 될 수 있다.

[0021] 한편, 2차 추출과정에서 분리된 지방산 글리세롤에스터는 바이오디젤 제조에 적합한 원료임이 밝혀졌다.

[0022] 추출된 지방산 글리세롤에스터는 유리지방산, 수분, 엽록체 및 기타 지질등을 포함하고 있어서, 보편적인 바이오디젤 제조방법인 염기촉매를 이용한 바이오디젤 전환 공정을 사용할 경우 불순물의 생성이 많아 바람직하지 않다. 이에, 본 발명자들은 본 발명에 의해 분리된 지방산 글리세롤에스터로부터 바이오디젤을 제조하는 신규한 방법을 발명하였다.

[0023] 본 발명의 또 다른 일 관점에 따르면,

[0024] 배양후 회수한 미세조류 균체를 건조하는 건조 단계; 상기 건조된 균체를 파쇄하지 않고 1차 추출용매로 추출하여, 고상-액상으로 분리하는 1차 추출단계; 분리된 고상을 2차 추출용매로 추출한 후 층분리를 하는 2차 추출단계; 분리된 상층으로부터 용매를 휘발시켜 지방산 글리세롤에스터를 회수하는 회수단계; 상기 지방산 글리세롤에스터에 메탄올과 황산을 가하고 혼합하여 혼합액을 생성하는 혼합단계; 및 상기 혼합액을 가열 환류시킨 후 3차 추출용매로 추출하는 3차 바이오디젤전환 단계를 포함하는 바이오디젤 제조방법이 제공된다.

[0025] 상기 미세조류는 탄화수소를 세포 외부로 분비하여 표면에 축적하는 탄화수소 외부축적 미세조류일 수 있으며, 상기 탄화수소 외부축적 미세조류는 보트리오코커스 브라우니(*Botryococcus braunii*), 오란티오키트리움(*Aurantiochytrium* sp.) 또는 노스톡 무스코룸(*Nostoc muscorum*)일 수 있고, 긴사슬 탄화수소의 생산성이 우수한 보트리오코커스 브라우니(*Botryococcus braunii*) LB572 균주일 수 있다.

[0026] 본 발명의 일실시예에 따른 방법으로 제조된 바이오디젤은 올레산 및 근연지방산 함량이 75% 이상으로 높아 바이오디젤의 단점인 높은 온도에서 어는 현상과 산화에 의한 변질현상에 저항성이 있는 우수한 특성을 가지고 있다.

[0027] 이 때, 상기 건조단계는 동결건조, 분무건조 또는 열풍건조에 의해 수행될 수 있고, 동결건조에 의해 수행되는 것이 더 바람직할 수 있다.

[0028] 상기 1차 추출단계에서 건조된 균체는 파쇄되지 않은 균주일 수 있다. 세포를 사전에 파쇄하면 긴사슬 탄화수소와 지방산 글리세롤에스터를 구분하여 추출하는 선택성이 사라지므로 파쇄하지 않은 건조한 세포를 사용하는 것이 바람직하다. 상기 1차 추출용매는 추출효율이 우수해야 하고, 추출되는 물질을 변성시키지 않아야 하며, 사

용 후 쉽게 회수하여 재사용하기 위해, 비교적 낮은 휘발 온도 특성을 갖는 비극성 유기용매인 것이 바람직하며, 상기 낮은 휘발 온도 특성을 갖는 비극성 유기용매는 노르말헥산, 노르말헵탄, 사이클로헥산, 디에틸에테르 또는 이들 중 둘 이상의 혼합용매일 수 있다.

[0029] 상기 1차 추출단계의 추출 온도는 0 내지 40℃일 수 있고, 상온일 수 있으며, 15 내지 25℃일 수 있다.

[0030] 상기 2차 추출용매는 클로로포름/메탄올 혼합용매일 수 있으며, 상기 클로로포름/메탄올 혼합용매는 부피비가 1:4 내지 4:1일 수 있고, 1:2일 수 있다.

[0031] 상기 3차 추출단계의 가열환류는 2 내지 10시간 동안 수행될 수 있고, 더 바람직하게는 5 내지 8시간 동안 수행될 수 있으며, 상기 3차 추출용매는 낮은 휘발 온도 특성을 갖는 비극성 유기용매일 수 있으며, 상기 낮은 휘발 온도 특성을 갖는 비극성 유기용매는 노르말헥산, 노르말헵탄, 사이클로헥산, 디에틸에테르 또는 이들 중 둘 이상의 혼합용매일 수 있다.

발명의 효과

[0032] 상기한 바와 같이 이루어진 본 발명의 일 실시예에 따르면, 미세조류의 균체로부터 긴사슬 탄화수소와 글리세롤에스터를 구분하여 효율적으로 생산할 수 있을 뿐만 아니라, 상기 글리세롤에스터로부터 효율적으로 바이오디젤을 생산할 수 있다. 물론 이러한 효과에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

도면의 간단한 설명

[0033] 도 1은 보트리오코커스 브라우니 LB 572의 바이오디젤과 긴사슬 탄화수소의 가스크로마토그램이다.

도 2는 본 발명의 일실시예에 따른 방법에 의해 추출된 보트리오코커스 브라우니 LB 572의 긴사슬 탄화수소가 담긴 시험관을 촬영한 사진이다.

도 3은 본 발명의 일실시예에 따른 방법으로 추출된 바이오디젤이 담긴 시험관을 촬영한 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0034] 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.

[0035] **실시예 1: 보트리오코커스 브라우니 LB 572 건조 균체의 제조**

[0036] 2.5 L 원통형 버블컬럼 배양기 2대에 각각 BG-11 배지(표 1 BG-11 배지 조성)를 2 L를 넣고 BG-11 배지에서 유지 배양한 보트리오코커스 브라우니(*Botryococcus braunii*) LB 572를 각각 100 ml 접종한 다음 30일간 2% CO_2를 포함한 공기를 0.2 vvm으로 공급하며 60 μE/m^2/s의 빛을 쬐며 20~25℃에서 배양하여 종배양을 하였으며 70 L를 배양할 수 있는 평판형광생물 반응기(바이오트론사 제조)에 BG-11 배지를 70 L 넣고 종배양액 4 L를 접종한 다음 20 일간 2% CO_2를 포함한 공기를 0.2 vvm으로 공급하며 광도 60 μE/m^2/s의 빛을 쬐며 20~25℃에서 배양하였다. 배양액을 125 mm 원심분리관이 장착된 튜블라 세퍼레이터(한일과학 J-1250)를 사용하여 7,000 RPM에서 원심분리하여 세포를 회수 하였으며 회수한 세포를 -80℃에서 동결한 다음 -40℃에서 동결 건조하여 165 g의 건조 보툴리오코커스 브라우니 LB 572 균체를 수득하였다.

표 1

[0037] BG-11 배지 조성

구성 성분	g/L
$NaNO_3$	1.5
K_2HPO_4	0.04
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.075
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.036
Citric acid	0.006
Ferric Ammonium Citrate	0.006

EDTA, 2Na-Mg salt	0.001
Na_2CO_3	0.02
H_3BO_3	0.00286
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0.00181
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.00022
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.000391
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.00008
$CO(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	0.00005

[0038] **실시예 2: 유기용매 추출에 의한 긴사슬 탄화수소의 추출**

[0039] 상기 실시예 1에서 제조한 보트리오코커스 브라우니 LB 572 동결건조균체 각각 3 g에 각각 60 ml의 노르말헥산, 클로로포름, 메탄올을 넣은 후 하룻밤 마그네틱 교반기로 15 ~ 25℃에서 교반한 다음 와트만 번호 2번 여과지를 사용하여 감압여과를 수행하여 여액을 감압 하에서 완전농축하여 조탄화수소 추출농축물을 수득하였다. 각각의 조탄화수소 추출농축물에 5 ml의 3%(w/v)황산-메탄올 용액을 넣은 후 5시간 가열환류 반응을 한 다음 냉각한 반응액 0.1 ml에 4 ml의 노르말헥산을 가하여 볼텍스 믹서로 추출한 후 노르말헥산 층을 0.5 ml 분취하여서 히팅블럭에서 가열하여 완전농축한 다음 0.5 ml의 0.3 mg/ml 나프탈렌/노르말 헵탄용액으로 용해 후 가스크로마토그래피로 분석하여 긴사슬 탄화수소와 바이오디젤의 함량을 분석하였다. 가스크로마토그래피 분석방법은 하기 실험예와 같다.

[0040] **실험예 1: 긴사슬 탄화수소와 바이오디젤의 가스크로마토그라피 분석 방법**

[0041] **1-1: 함량분석을 위한 가스크로마토그라피 분석**

[0042] 영린 M600D 가스크로마토그라피 기기를 사용하여 5% 페닐폴리디메틸실록산 (phenylpolydemthylsiloxane)이 교차결합된 DH-5HT 충진제가 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 상승 시키고 380℃까지 분당 30℃로 상승시킨 후 380℃에서 10분간 유지하여 분석하였다. 이동상으로 헬륨가스를 분당 3 ml씩 흘렸으며 주입구 온도는 300℃, 검출기는 불꽃이온화검출기(FID)를 380℃에서 사용하였으며 샘플은 1 μl를 주입하였다.

[0043] 내부표준 물질로 나프탈렌을 0.3 mg/ml로 노르말헵탄에 용해하여 사용하였고 대조 표준물질로 대두유로 자가 제조한 바이오디젤 (순도 99.5% KS M 2413 방법)과 자가 제조한 보트리오코커스 브라우니 LB 572의 대조 표준 긴사슬 탄화수소(GC 97%)를 사용하여 분석하였다.

[0044] 보트리오코커스 브라우니 LB 572의 긴사슬 탄화수소는 16분에서 21분 사이에서 검출되며 바이오디젤은 7분에서 12분 사이에서 검출된다 (도 1).

[0045] **1-2: 긴사슬 탄화 수소의 함량계산**

[0046] 내부 표준물질로 나프탈렌을 0.3 mg/ml로 노르말헵탄에 용해하여 사용하였고 내부 표준물질인 나프탈렌 피크의 면적과 긴사슬 탄화수소의 검출 시간대인 16분에서 21분 사이의 피크의 면적 합으로 긴사슬 탄화수소의 양을 정량하였으며 정량에 사용한 계산식은 아래와 같다.

[0047] $$\text{긴사슬 탄화수소의 량(g)} = \frac{[\Sigma A]_{sample}/A_{Isample}}{[\Sigma A]_{std}/A_{Istd}} \times (m_{std}/V_{std}) \times 0.97 \times V_{sample}$$

[0048] $[\sum A]_{std}$: 대조 표준 긴사슬 탄화수소 분석시 RT16에서 RT21까지 피크의 총면적

[0049] A_{Istd}: 대조 표준 긴사슬 탄화수소 분석시 내부 표준물질 피크의 면적

[0050] m_{std} : 대조 표준 긴사슬 탄화수소의 취한 시료무게(g)

[0051] V_{std} : 대조 표준 긴사슬 탄화수소를 용해한 나프탈렌용액의 부피(ml)

[0052] $[\sum A]_{sample}$: 분석 샘플의 RT16에서 RT21까지 피크의 총면적

[0053] $A_{Isample}$: 분석 샘플의 나프탈렌(내부표준)의 면적

[0054] V_{sample} : 분석 샘플의 추출한 노르말헥산 부피(ml)

[0055] **1-3: 바이오디젤의 함량 계산**

[0056] 내부 표준물질로 나프탈렌을 0.3 mg/ml로 노르말헵탄에 용해하여 사용하였고 내부 표준물질인 나프탈렌 피크의 면적과 바이오디젤의 검출 시간대인 7분에서 12분 사이의 피크의 면적 합으로 바이오디젤의 양을 정량하였으며 정량에 사용한 계산식은 아래와 같다.

[0057] $$\text{바이오디젤 량(g)} = \frac{[\Sigma A]_{sample}/A_{Isample}}{[\Sigma A]_{std}/A_{Istd}} \times (m_{std}/V_{std}) \times 0.995 \times V_{sample}$$

[0058] $[\sum A]_{std}$: 대조표준 대두유 바이오디젤 분석시 RT7에서 RT12까지 피크의 총면적

[0059] A_{Istd}: 대조표준 대두유 바이오디젤 분석시 내부 표준물질 피크의 면적

[0060] m_{std}: 대조 표준 대두유 바이오디젤의 취한 시료무게(g)

[0061] V_{std}: 대조 표준 대두유 바이오디젤 용해한 나프탈렌용액의 부피(ml)

[0062] $[\sum A]_{sample}$: 분석 샘플의 RT7에서 RT12까지 피크의 총면적

[0063] $A_{Isample}$: 분석 샘플의 나프탈렌(내부표준)의 면적

[0064] V_{sample} : 분석 샘플의 추출한 노르말헥산 부피(ml)

[0065] 상술한 방법으로 실시예 2에서 추출한 각각의 노르말헥산층의 성분 분석을 수행하였으며, 그 결과는 하기 표 2와 같다.

표 2

[0066] 용매 추출물의 각종 성분 함량

용매	20℃에서 조탄화수소 추출물의 성상	조탄화수소 추출물의 수득량(g): A	긴사슬 탄화수소의 분석값(g): B	바이오디젤의 분석값(g): C	추출물의 긴사슬 탄화수소 순도(%): (B/A)X100
노르말헥산	갈색 고체	0.49	0.46	0.01	94
클로로포름	연두색 고체	0.44	0.37	0.02	84
메탄올	진한초록 반고체	0.39	0.30	0.05	77

[0067] 상기 표 2에서 보는 바와 같이, 노르말헥산으로 추출한 경우 조탄화수소 추출물의 수득량, 긴사슬탄화수소의 수득량이 가장 높았고, 긴사슬 탄화수소의 순도에 있어서도 94%로 가장 순도가 높음을 알 수 있었다. 이는 다른 추가 정제 과정 없이 곧바로 연료로 사용할 수 있는 수준으로 분리 정제가 되었음을 의미한다. 반면, 바이오디젤의 경우 노르말헥산으로 추출한 경우에는 0.01 g에 불과한 반면, 메탄올로 추출한 경우에는 이의 다섯배인 0.05 g임에도 긴사슬탄화수소의 추출량은 현저히 감소함을 알 수 있었다.

[0068] **실시예 3: 긴사슬 탄화수소의 추출**

[0069] 본 발명자들은 상기 실험예 1의 결과를 통해 긴사슬 탄화수소의 분리를 위해 분쇄하지 않은 보트리오코커스 브라우니 균체를 노르말헥산으로 추출하는 것이 가장 효율성이 좋음을 알 수 있었다. 이에, 추출 규모를 확대하여 42.20 g의 동결건조한 보트리오코커스 브라우니 LB 572 동건건조세포를 페이퍼 필터컵이 장착된 속슬렛 추출장치에 채워 넣은 후 플라스크에는 350 ml의 노르말헥산을 넣고 가열하여 기화된 노르말헥산을 응축한 액으로 추출 후 회수하는 과정을 20회 반복하여 추출하였다. 추출된 탄화수소/노르말헥산 용액을 회전 증발장치를 사용하여 50℃ 수욕에서 감압 하에서 농축한 다음 1 mmHg의 고진공 상태에서 증발시키고 남은 갈색 투명액으로 7.31 g의 긴사슬 탄화수소를 수득했으며 실온에서 고체로 굳어졌다(도 2). 추출 농축하여 제조한 긴사슬 탄화수소에 대하여 가스크로마토그래피로 분석한 결과 긴사슬 탄화수소의 함량은 94.7%이었다.

[0070] **실시예 4: 긴사슬 탄화수소의 추출**

[0071] 본 발명자들은 추출방법을 약간 달리하여, 100 g의 동결건조한 보트리오코커스 브라우니 LB 572 동결건조세포를 2 L 삼각플라스크에 넣고 1 L 노르말헥산을 가하여 마그네틱 교반기로 하룻밤 실온에서 교반한 다음 와트만 번호 2 여지로 감압 여과한 다음 여액을 농축하여 15.1 g의 실온에서 굳는 갈색의 추출물을 수득했으며, 가스크로마토그래피로 분석된 긴사슬 탄화수소의 함량은 95.1%이었다.

[0072] 분리된 긴사슬 탄화수소는 원소분석을 하였을 때$(CH_{2.1}O_{0.04})n$로 구성되어 있으며 GC-MS 방법으로 분석하였을 때 분자량 375~440 사이의 물질이 주요 구성물질로서 열량은 10,191 cal/g이고 녹는점은 27~33℃이었다.

[0073] **실시예 5: 지방산 글리세롤에스터의 분리**

[0074] 실시예 3에서 노르말헥산으로 추출하고 남은 보툴리오코커스 브라우니 LB 572 건조세포 3 g에 메탄올/클로로포름 혼합용매{혼합비(v:v)=2:1, 1:1, 1:2}를 각각 30 ml 가하여 15~20℃ 사이에서 밤새 마그네틱교반기로 교반을 하여 추출을 한 다음 와트만 번호2 여과지로 여과하고 여액을 감압 농축하여 조지방산 글리세롤에스터 농축물을 얻었다. 각각의 농축물에 5 ml의 3%(w/v)황산-메탄올 용액을 넣은 후 5시간 가열 환류반응을 한 다음 냉각한 반응액 0.1 ml에 4 ml의 노르말헥산을 가하여 볼텍스 믹서로 현탁시켰다. 층분리후, 0.5 ml의 노르말헥산 층을 분취하여서 히팅블럭에서 가열하여 농축한 다음 0.5 ml의 0.3 mg/ml 나프탈렌/노르말헵탄 용액으로 용해한 후 가스크로마토그래피로 분석하여 긴사슬 탄화수소와 바이오디젤의 함량을 분석하였다. 함량 분석은 상기 실험예 1의 방법을 사용하였다. 분석 결과는 하기 표 3과 같다.

표 3

[0075] 지방산 글리세롤에스터의 추출

$CHCl_3$:메탄올 (v:v)	20℃에서 지방산 글리세롤에스터의 성상	수득량(g)	긴사슬 탄화수소의 분석값(g)	바이오디젤의 분석값(g)	지방산 글리세롤에스터의 순도(%)
1:2	짙은 초록 점액	0.42	0.05	0.27	64
1:1	짙은 초록 점액	0.37	0.05	0.24	65
2:1	짙은 초록 점액	0.31	0.04	0.21	68

[0076] 상기에서 표 2에서 나타난 바와 같이, 클로로포름/메탄올 혼합용매의 부피비가 1:2일 때 추출된 조지질의 양이 많았으며, 바이오디젤로 전환하였을 때 바이오디젤의 양도 많았다. 이는 클로로포름/메탄올 부피비 1:2 혼합용매로 추출하였을 때 지방산의 글리세롤에스터가 가장 효율적으로 추출됨을 의미하며, 추출 농축하여 제조한 지질 잔사를 바이오 디젤로 전환하여 GC로 분석하여 산출한 바이오디젤양을 지질 잔사로 나눈 값이 모두 60% 이상으로 이는 추출액 농축 잔사 중의 지방산글리세롤의 함량이 60% 이상이라는 것으로 선택적으로 지방산글리세롤이 높은 함량으로 추출되었음을 의미한다.

[0077] **실시예 6: 지방산 글리세롤에스터의 분리와 바이오디젤의제조**

[0078] 실시예 4에서 노르말헥산으로 추출하고 남은 보트리오코커스 브라우니 LB 572를 실온에서 하룻밤 건조한 건조세포 81g에 메탄올 540 ml을 넣어 1시간 교반 후 클로로포름 270 ml을 넣어 하룻밤 실온에서 마그네틱 교반기로 교반하여 추출하였다. 와트만 번호2 여지를 사용하여 감압여과를 하여 세포와 추출액을 분리하였으며 위의 추출과정을 2회 반복하여 추출액을 합하여 회전증발장치를 사용해서 농축하여 진한 초록색 점액의 농축잔사 21.06 g을 수득했다.

[0079] 농축잔사에 105 ml의 3%(w/v) 황산/메탄올을 가한 다음 5시간 가열 환류 반응을 하고 각각 420 ml와 210 ml 노르말헥산을 사용하여 2회 추출 후 추출한 노르말헥산 용액을 합하여 210 ml 증류수를 사용하여 세척한 다음 노르말 헥산 용액을 감압농축하여 조바이오디젤 13.51 g을 수득한 후 1 mmHg의 감압조건 하에서 138~143℃에서 증류하여 바이오디젤 8.71 g을 수득하였다(도 3).

[0080] **실험예 2 : 바이오디젤의 지방산 구성분석**

[0081] 동일 SIMADZU GC-MS-QP2010 Plus 기기를 사용하여 비스시아노프로필 폴리실록센(biscyanopropyl polysiloxane) 충진제가 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 Mass spectrometry(MS)를 사용하여 250℃에서 검출 전압은 1.5 kV를 사용하였고 샘플은 1 μl를 주입하였다. 정량에 사용한 계산식은 아래와 같다.

[0082] $$\text{특정지방산 Methyl Ester 함량}(\%)=\frac{A_o}{\Sigma A}\times 100\%$$

[0083] ΣA: 지방산의 메틸에스터 피크의 총면적

[0084] A_o: 특정지방산 Methyl Ester의 피크면적

[0085] 수득된 바이오디젤은 지방산의 메틸에스터로서 실험예 2의 방법으로 분석하였을 때 지방산 조성은 표 4와 같으며 제조한 바이오디젤의 구름점은 4℃이었다.

표 4

[0086] 보트리오코커스 브라우니 LB 572 바이오디젤의 지방산 조성

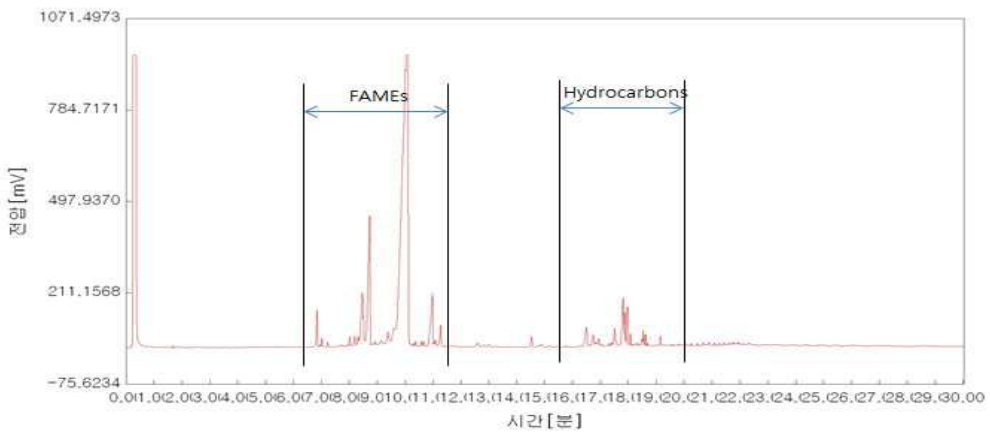
성분	백분율(%)	상대분포	비고
팔미트산	8.3	1.00	포화지방산
팔미톨레산	1.1	0.14	불포화지방산
스테아르산	0.1	0.01	포화지방산
올레산	76.4	9.21	불포화지방산
리놀레산	4.1	0.49	불포화지방산
리놀렌산	10.0	1.20	불포화지방산
총계	100.0		
포화지방산	8.4	1.00	
단일불포화지방산	77.5	9.23	
다중불포화지방산	14.1	1.67	

[0087] 상기 표 4에서 보는 바와 같이, 본 발명의 일실시예에 의해 생산된 바이오디젤은 단일불포화지방산인 올레산의 비율이 77.5%에 이르러, 통상적인 대두유를 이용한 바이오디젤의 60%보다 현저하게 높음을 알 수 있었다. 이는 보트리오코커스 브라우니 LB 572가 바이오디젤의 생산에 적합한 미세조류임을 시사하는 것이다.

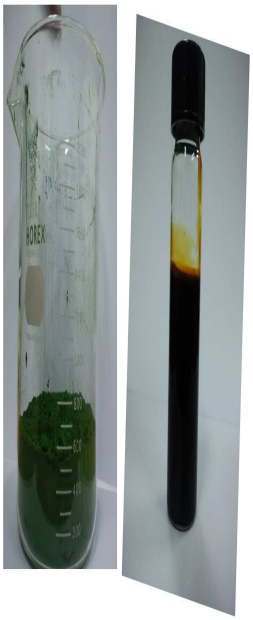
[0088] 본 발명은 상술한 실시예 및 실험예를 참고로 설명되었으나 이는 예시적인 것에 불과하며, 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 이로부터 다양한 변형 및 균등한 다른 실시예가 가능하다는 점을 이해할 것이다. 따라서 본 발명의 진정한 기술적 보호 범위는 첨부된 특허청구범위의 기술적 사상에 의하여 정해져야 할 것이다.

도면

도면1



도면2



도면3

