

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구  
국제사무국

(43) 국제공개일  
2023년 5월 11일 (11.05.2023) WIPO | PCT



(10) 국제공개번호  
WO 2023/080743 A1

(51) 국제특허분류:  
A01N 43/16 (2006.01) A01N 63/20 (2020.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2022/017346

(22) 국제출원일: 2022년 11월 7일 (07.11.2022)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:  
10-2021-0152494 2021년 11월 8일 (08.11.2021) KR

(71) 출원인: 고려대학교 산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) [KR/KR]; 02841 서울특별시 성북구 안암로 145, Seoul (KR).

(72) 발명자: 최윤이 (CHOI, Yoon E); 02841 서울특별시 성북구 안암로 145, Seoul (KR). 박윤환 (PARK, Yun

Hwan); 02856 서울특별시 성북구 고려대로28길 21, Seoul (KR). 김석 (KIM, Sok); 02715 서울특별시 성북구 길음로13길 39, Seoul (KR).

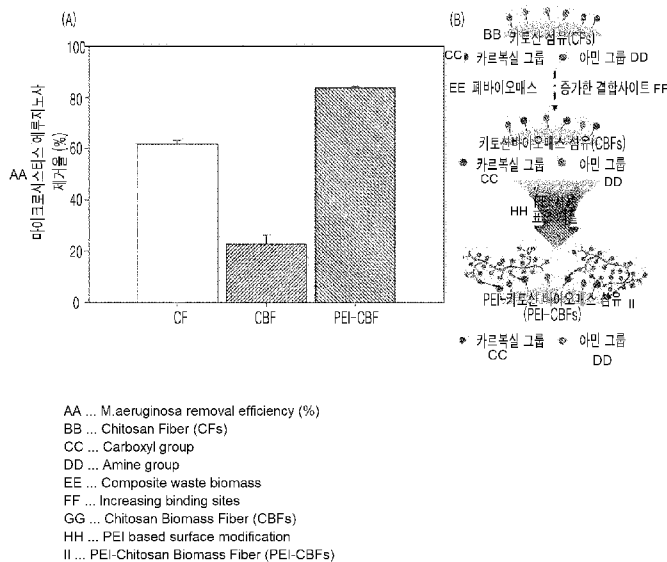
(74) 대리인: 특허법인 남앤남 (NAM & NAM); 04516 서울특별시 중구 서소문로 95, 3층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(54) Title: CHITOSAN-BIOMASS COMPOSITE FOR REMOVING HARMFUL CYANOBACTERIA CAUSING GREEN ALGAE AND METHOD FOR RECYCLING SAME

(54) 발명의 명칭: 녹조를 유발하는 유해 남세균 제거용 키토산-바이오매스 복합체 및 이의 재생 방법

[도 1]



(57) Abstract: The present invention relates to a chitosan-biomass composite for removing cyanobacteria; a method for removing green algae using same; a method for collecting cyanobacteria from a chitosan-biomass composite; and a method for recycling a chitosan-biomass composite for removing cyanobacteria. The chitosan-biomass composite of the present invention is not only environmentally friendly as natural chitosan and waste biomass generated in industrial processes are used but also can effectively adsorb negatively charged harmful cyanobacterial cells because the chitosan-biomass composite contains a large amount of amine groups due to the surface of the composite material being modified with a cationic polymer. In particular, since the chitosan-biomass composite of the present invention is not ecotoxic, the chitosan-biomass composite has the advantage of minimizing various negative effects, such as toxicity to the aquatic ecosystem when in actual use. In addition, the present invention can detach cyanobacteria cells from the chitosan-biomass composite, while maintaining the cell structure without destroying the cyanobacteria cells, by using a basic solution at a specific concentration and ultrasonic treatment, such that the present invention has the advantage that the chitosan-biomass composite

[다음 쪽 계속]

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

규칙 4.17에 의한 선언서:

— 신규성을 해치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의 예외에 관한 선언 (규칙 4.17(v))

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

can be used industrially as biofuels, bioenergy, etc. by using the harmful cyanobacteria cells collected via the detaching step. Furthermore, since the chitosan-biomass composite of the present invention can be recycled (reused) through washing and drying processes, the chitosan-biomass composite can be effectively used as an ecofriendly and economical material.

(57) 요약서: 본 발명은 남세균 제거용 키토산-바이오매스 복합체; 이를 이용한 녹조 제거 방법; 및 키토산-바이오매스 복합체로부터 남세균을 회수하는 방법; 및 남세균 제거용 키토산-바이오매스 복합체의 재생 방법에 관한 것이다. 본 발명의 키토산-바이오매스 복합체는 천연 소재인 키토산 및 산업 공정에서 발생하는 폐바이오매스를 활용하기 때문에 환경 친화적일 뿐 아니라, 복합 소재의 표면을 양이온성 고분자로 개질시킴으로써 다량의 아민기를 포함하는바, 음전하를 띄는 유해 남세균 세포를 효과적으로 흡착할 수 있다. 특히, 본 발명의 키토산-바이오매스 복합체는 생태독성이 없는바, 실제 사용에 따른 수생생태계의 독성 등 각종 부정적 영향을 최소화시킬 수 있는 이점을 가진다. 또한, 본 발명에서는 특정 농도의 염기성 용액 및 초음파 처리를 통해 키토산-바이오매스 복합체로부터 남세균 세포를 파괴시키지 않으면서, 세포 구조를 잘 유지한채로 세포를 탈착시킬 수 있는바, 본 발명의 탈착 과정을 통해 회수한 유해 남세균 세포를 이용하여 산업적 활용(바이오 연료, 바이오 에너지 등)이 가능한 이점을 가진다. 또한, 본 발명의 키토산-바이오매스 복합체는 세척 및 건조과정을 통해 재생(재활용)이 가능한바, 친환경적이고 경제적인 소재로서 유용하게 사용될 수 있다.

## 명세서

### 발명의 명칭: 녹조를 유발하는 유해 남세균 제거용 키토산-바이오매스 복합체 및 이의 재생 방법

#### 기술분야

- [1] 본 발명은 남세균 제거용 키토산-바이오매스 복합체; 이를 이용한 녹조 제거 방법; 및 키토산-바이오매스 복합체로부터 남세균을 회수하는 방법; 및 남세균 제거용 키토산-바이오매스 복합체의 재생 방법에 관한 것이다.

#### 배경기술

- [2] 녹조(algal bloom)란 강 또는 호수 등 담수환경에서 남조류(*Cyanobacteria*)의 이상번식으로 인해 물의 색깔이 짙은 녹색으로 변하는 현상을 이야기한다. 최근 지구온난화에 따른 평균기온의 상승과 더불어 담수환경 주변에 위치한 각종 오염원에서의 오염물질 유입으로 인해 녹조현상의 정도와 빈도가 현저하게 증가하고 있으며 그 피해 정도는 해가 거듭될수록 심각해지고 있는 실정이다. 남조류는 수환경에 bloom 을 일으켜 수중 탁도를 증가시켜 미관상 좋지 않을 뿐만 아니라 수중 산소를 빠르게 소비하여 타 생물의 생장을 방해하고 악취와 독소를 유발하는 등 환경생태학적인 문제점을 야기한다. 현재 이런 녹조현상은 국내에만 국한되어 있는 것이 아닌 전 세계적인 이슈로서 주목받고 있으며 이에 따른 해결책이 다방면으로 연구되고 있다.
- [3] 국내에서 녹조현상을 일으키는 주요 남조류의 종류는 마이크로시스티스 속(*Microcystis*), 아나베나 속(*Anabaena*), 아파니조메논 속(*Aphanizomenon*) 및 오실라토리아 속(*Oscillatoria*) 으로서 위 4종은 독성물질을 배출하여 환경에 유해한 영향을 줄 수 있기 때문에 환경부에서 유해남조류로 지정되어 관리되고 있다. 이들은 통상적으로 수온 22°C 이상에서 매우 활발하게 증식하며 위 4가지 종류 중 특히 마이크로시스티스 에루기노사(*Microcystis aeruginosa*)는 가장 보편적으로 녹조현상을 일으키는 남조류에 속한다.
- [4] 마이크로시스테스 에루기노사는 마이크로시스틴(*Microcystin*)이라는 독성 물질을 방출하는 것으로 알려져 있다. 마이크로시스틴은 70여가지 변종이 있으나 이중 마이크로시스틴-LR(*Microcystin-LR*)의 독성이 가장 강하며 이들은 포유류가 섭취하게 될 시 간독성 및 신경계 독성을 나타내는 것으로 알려져 있고 이러한 이유로 세계보건기구(WHO)에서는 음용수의 조류 독소 농도를 1µg/L로 제한하고 있다. 조류 독소의 증가는 직접적인 독소문제 이외에도 수처리비용의 증가와 친수활동 제한을 야기하는 등 우리 생활과 밀접하게 연관되어 생활의 질을 낮출 수도 있을 만큼 위협적인 실정이다. 이에, 수자원을 지속적으로 유지하기 위해서는 수계에서 마이크로시스테스 에루기노사를 제거 및 제어할 필요성이 있다.
- [5] 한편, 마이크로시스테스 에루기노사는 약 57%의 탄수화물과 28%의 지질을

세포에 포함하고 있기 때문에 바이오 연료의 중요한 자원이 될 수 있다. 그러나, 기존의 녹조 제어 방법(황토살포, 수차, 초음파 조류제거기, 조류제거선, 과산화수소 처리)은 마이크로시스테스 에루기노사 세포를 수확하는데 어려움이 있으며, 세포 용해를 유발하여 마이크로시스테스 에루기노사가 수중 생태계로 방출됨으로써 남세균 세포를 이용하여 산업적 활용(바이오 연료, 바이오 에너지 등)이 불가능한 문제점을 가지고 있다.

- [6] 이러한 배경 하에, 본 발명자는 녹조 제거 기능성을 가진 친환경 소재를 연구하던 중 표면이 양이온성 폴리머로 개질된 남세균 제거용 키토산-바이오매스 복합체를 개발하였으며, 상기 소재가 녹조현상을 일으키는 주요한 남조류에 해당하는 마이크로시스테스 에루기노사(*Microsystis aeruginosa*)를 효과적으로 제거(흡착)할 수 있음을 확인하였다. 또한, 특정 농도의 염기성 용액 및 초음파 처리를 통해 키토산-바이오매스 복합체로부터 남세균을 효과적으로 탈착시킬 수 있으며, 탈착 과정을 통해 회수한 남세균이 재생에너지원으로서 산업적으로 활용이 가능한 형태임을 확인하였다. 또한, 탈착 과정 후 복합체를 세척하고 건조시키는 과정을 통해 재생이 가능함을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

## 발명의 상세한 설명

### 기술적 과제

- [7] 따라서 본 발명의 목적은 녹조를 유발하는 유해 남세균을 효과적으로 제거할 수 있는 있는 키토산-바이오매스 복합체를 제공하는 것이다.
- [8] 본 발명의 다른 목적은 상기 키토산-바이오매스 복합체를 이용하여 녹조를 제거하는 방법을 제공하는 것이다.
- [9] 본 발명의 또 다른 목적은 남세균이 흡착된 키토산-바이오매스 복합체로부터 남세균을 효과적으로 회수하는 방법을 제공하는 것이다.
- [10] 본 발명의 또 다른 목적은 키토산-바이오매스 복합체를 재활용하는 방법을 제공하는 것이다.

### 과제 해결 수단

- [11] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위해서,
- [12] 본 발명은 표면이 양이온성 폴리머로 개질된 남세균 제거용 키토산-바이오매스 복합체를 제공한다.
- [13] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 양이온성 폴리머는 아민기-함유 양이온성 폴리머일 수 있다.
- [14] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 아민기-함유 양이온성 폴리머는 폴리에틸렌아민, 아민-터미네이티드 폴리에틸렌옥사이드, 아민-터미네이티드 폴리에틸렌/프로필렌 옥사이드, 디메틸 아미노 에틸 메타크릴레이트의 폴리머 및 디메틸 아미노에틸 메타크릴레이트와 비닐피롤리돈의 코폴리머, 에피클로로하이드린과 디메틸아민의 선형 폴리머, 폴리디알릴디메틸암모늄

클로라이드, 폴리에탄올아민/메틸클로라이드 및 개질된 폴리에틸렌이민으로 구성되는 군에서 선택될 수 있다.

- [15] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 바이오매스는 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*)일 수 있다.
- [16] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 남세균 제거용 키토산-바이오매스 복합체는 a) 키토산 용액을 준비하는 단계; b) 키토산 용액에 바이오매스 분말을 혼합하여 키토산-바이오매스 혼합용액을 제조하는 단계; c) 상기 혼합용액을 방사하여 키토산-바이오매스 복합 섬유를 제조하는 단계; d) 상기 복합 섬유를 글루타르알데하이드 용액에 넣은 후 가교 반응을 진행시키는 단계; 및 e) 가교 반응이 진행된 복합 섬유를 양이온성 폴리머 용액에 넣고 반응시켜 복합 섬유의 표면을 개질시키는 단계를 포함하는 과정을 통해 제조될 수 있다.
- [17] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 e) 단계에서 양이온성 폴리머는 폴리에틸렌이민(polyethyleneimine)일 수 있다.
- [18] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 남세균은 녹조를 유발하는 마이크로시스티스 에루지노사(*Microcystis aeruginosa*)일 수 있다.
- [19] 또한, 본 발명은 상기 남세균 제거용 키토산-바이오매스 복합체를 녹조 발생 수역 또는 발생징후가 관찰된 수역에 처리하는 단계를 포함하는, 녹조 제거방법을 제공한다.
- [20] 또한, 본 발명은 상기 남세균 제거용 키토산-바이오매스 복합체를 녹조 발생 수역에 처리하여 남세균을 흡착시키는 단계; 및 남세균이 흡착된 키토산-바이오매스 복합체를 0.1M의 NaOH 용액에 첨가한 후 40kHz 초음파를 처리하는 단계를 포함하는, 키토산-바이오매스 복합체로부터 남세균을 회수하는 방법을 제공한다.
- [21] 또한, 본 발명은 1) 상기 남세균 제거용 키토산-바이오매스 복합체를 녹조 발생 수역에 처리하여 남세균을 흡착시키는 단계; 2) 남세균이 흡착된 키토산-바이오매스 복합체를 0.1M의 NaOH 용액에 첨가한 후 40kHz 초음파를 처리하여 남세균을 탈착시키는 단계; 및 3) 남세균이 탈착된 키토산-바이오매스 복합체를 증류수를 이용하여 중성(pH 7)이 될 때까지 세척한 후 55~60°C에서 20~30시간 동안 건조시키는 단계를 포함하는, 남세균 제거용 키토산-바이오매스 복합체의 재생 방법을 제공한다.

### 발명의 효과

- [22] 본 발명의 키토산-바이오매스 복합체는 천연 소재인 키토산 및 발효산업공정에서 발생하는 폐바이오매스를 활용하기 때문에 환경 친화적일 뿐만 아니라, 복합 소재의 표면을 양이온성 고분자로 개질시킴으로써 다량의 아민기를 포함하는바, 음전하를 띄는 유해 남세균 세포를 효과적으로 흡착할 수 있다. 특히, 본 발명의 키토산-바이오매스 복합체는 생태독성이 없는바, 실제 사용에 따른 수생생태계의 독성 등 각종 부정적 영향을 최소화시킬 수 있는

이점을 가진다.

- [23] 또한, 본 발명에서는 특정 농도의 염기성 용액 및 초음파 처리를 통해 키토산-바이오매스 복합체로부터 남세균 세포를 파괴시키지 않으면서, 세포 구조를 잘 유지한채로 세포를 탈착시킬 수 있는바, 본 발명의 탈착 과정을 통해 회수한 유해 남세균 세포를 이용하여 산업적 활용(바이오 연료, 바이오 에너지 등)이 가능한 이점을 가진다.
- [24] 또한, 본 발명의 키토산-바이오매스 복합체는 세척 및 건조과정을 통해 재생(재활용)이 가능한바, 친환경적이고 경제적인 소재로서 유용하게 사용될 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

- [25] 도 1에서 (A)는 본 발명에 따른 흡착제의 12시간 처리 후 *M. aeruginosa* 세포의 제거율을 나타내는 그래프이며, (B)는 본 발명 흡착제의 개발 과정을 보여주는 개략도이다.
- [26] 도 2는 본 발명 CBF 및 PEI-CBF 흡착제의 N<sub>1s</sub> 스펙트럼을 나타낸 것이다((A): CBF, (B): PEI-CBF).
- [27] 도 3은 본 발명 CBF 및 PEI-CBF 흡착제 처리 후 시간 경과에 따른 인(P) 소비량을 측정한 결과이다.
- [28] 도 4는 본 발명 PEI-CBF 흡착제의 생태독성 평가를 위하여 PEI-CBF 흡착제 존재 하에서 물벼룩(*Daphnia magna*)을 배양한 후 12시간 및 48시간이 경과하였을 때 물벼룩의 생존율을 측정한 결과이다.
- [29] 도 5는 녹조 발생 단계에 따른 본 발명 PEI-CBF 흡착제의 적용 가능성을 평가하기 위하여 남조류의 다양한 세포 밀도에서 PEI-CBF 흡착제 처리 후 시간경과에 따른 세포 밀도 변화를 측정한 결과이다(a: 저밀도, b: 중밀도, c: 고밀도).
- [30] 도 6은 0.01M NaOH 조건 하에서의 초음파 처리 세기에 따른 본 발명 PEI-CBF 흡착제의 탈착 효율을 나타낸 것이다.
- [31] 도 7은 40kHz 초음파 처리 시 NaOH 농도에 따른 본 발명 PEI-CBF 흡착제의 탈착 효율을 나타낸 것이다.
- [32] 도 8은 *M. aeruginosa* 세포의 제거 전·후 및 탈착 과정 후 PEI-CBF 흡착제의 색상 변화를 확인한 것이다.
- [33] 도 9는 *M. aeruginosa* 세포의 제거 전·후 PEI-CBF 흡착제의 표면의 변화를 FE-SEM 스캔을 통해 관찰한 사진이다(x500 배율).
- [34] 도 10은 원심분리를 통해 회수한 *M. aeruginosa* 세포; 및 PEI-CBF 흡착제를 이용하여 흡착-탈착 과정 후 회수한 *M. aeruginosa* 세포의 총 지질 함량을 측정한 것이다(Control: 원심분리에 의해 회수한 *M. aeruginosa* 세포의 총 지질 함량, Adsorptive collected: PEI-CBF 흡착제를 이용 흡착-탈착 과정 후 회수한 *M. aeruginosa* 세포의 총 지질 함량).

- [35] 도 11은 원심분리를 통해 회수한 *M. aeruginosa* 세포; 및 PEI-CBF 흡착제를 이용하여 흡착-탈착 과정 후 회수한 *M. aeruginosa* 세포를 트리판 블루 염색한 다음 현미경으로 관찰한 사진이다(좌: 원심분리에 의해 회수한 *M. aeruginosa* 세포, 우: PEI-CBF 흡착제를 이용 흡착-탈착 과정 후 회수한 *M. aeruginosa* 세포).
- [36] 도 12는 본 발명 PEI-CBF 흡착제의 1차 및 2차(탈착 과정을 통해 재생) 사용에 따른 *M. aeruginosa* 세포 제거율을 나타내는 그래프이다.

### 발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [37] 본 발명은 표면이 양이온성 폴리머로 개질된 남세균 제거용 키토산-바이오매스 복합체에 관한 것이다.
- [38] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 양이온성 폴리머는 아민기-함유 폴리머로서, 자세하게는, 폴리에틸렌이민, 아민-터미네이티드 폴리에틸렌옥사이드, 아민-터미네이티드 폴리에틸렌/프로필렌 옥사이드, 디메틸 아미노 에틸 메타크릴레이트의 폴리머 및 디메틸 아미노에틸 메타크릴레이트와 비닐피롤리돈의 코폴리머, 에피클로로히드린과 디메틸아민의 선형 폴리머, 폴리디알릴디메틸암모니움 클로라이드, 폴리에탄올아민/메틸클로라이드 및 개질된 폴리에틸렌이민 등을 예시할 수 있다.
- [39] 본 발명의 다른 구체예에서, 상기 바이오매스는 발효산업공정에서 배출되는 폐기물일 수 있으며, 바람직하게는 L-페닐알라닌 발효 과정에서 생성된 페바이오매스인 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*)일 수 있다.
- [40] 본 발명의 남세균 제거용 키토산-바이오매스 복합체는 a) 키토산 용액을 준비하는 단계; b) 키토산 용액에 바이오매스 분말을 혼합하여 키토산-바이오매스 혼합용액을 제조하는 단계; c) 상기 혼합용액을 방사하여 키토산-바이오매스 복합 섬유를 제조하는 단계; d) 상기 복합 섬유를 글루타르알데하이드 용액에 넣은 후 가교 반응을 진행시키는 단계; 및 e) 가교 반응이 진행된 복합 섬유를 양이온성 폴리머 용액에 넣고 반응시켜 복합 섬유의 표면을 개질시키는 단계를 포함하는 과정을 통해 제조될 수 있다.
- [41] 본 발명의 상기 a) 단계는 키토산 용액을 준비하는 단계로서, 자세하게는 키토산 분말을 5% 아세트산 용액에 24시간 동안 교반하면서 용해시켜 키토산 용액(6%wt)을 제조하는 단계이다.
- [42] 상기 b) 단계는 키토산-바이오매스 혼합용액을 제조하는 단계로서, 자세하게는 상기 a) 단계를 통해 준비한 키토산 용액(6%wt)에 분말 상태의 코리네박테리움 글루타미쿰 바이오매스(<50  $\mu$ m) 분말을 혼합하여 키토산/바이오매스 혼합용액(키토산:바이오매스=3:7 in suspension)을 제조하는 단계이다. 이때, 바이오매스가 키토산 용액에 균일하게 분산될 수 있도록 12시간 동안 교반을 진행할 수 있다.
- [43] 상기 c) 단계는 키토산-바이오매스 복합 섬유를 제조하는 단계로서,

자세하게는 상기 b) 단계를 통해 제조된 키토산-바이오매스 혼합용액을 방사용 니들을 통해 1M NaOH 용액에 방사하여 키토산-바이오매스 복합 섬유를 제조하는 단계이다.

- [44]     상기 d) 단계는 키토산-바이오매스 복합 섬유에 가교 반응을 진행시키는 단계로서, 자세하게는 상기 c) 단계를 통해 제조된 키토산-바이오매스 복합 섬유를 글루타르알데하이드 용액(0.6mL GA/L, 1M NaOH 기반)에 침지시키고 가교 반응을 위해 300rpm에서 1시간 동안 교반하는 단계이다.
- [45]     상기 d) 단계 후 d') 단계로의 가교 반응 후 용액에서 키토산-바이오매스 복합 섬유를 분리하고 증류수로 세척하여 섬유에 잔류하는 NaOH와 글루타르알데하이드(GA)를 제거하는 단계를 거칠 수 있다.
- [46]     상기 e) 단계는 키토산-바이오매스 복합 섬유의 표면을 개질시키는 단계로서, 자세하게는 상기 d) 단계 또는 d') 단계 후 키토산-바이오매스 복합 섬유를 양이온성 폴리머 용액에 넣고 37°C에서 6시간 동안 반응시킴으로써 복합 섬유 표면을 개질시키는 단계이다.
- [47]     상기 e) 단계에서 양이온성 폴리머 용액은 폴리에틸렌이민 용액(2% w/v)일 수 있다.
- [48]     상기 e) 단계 후 추가적으로 키토산-바이오매스 복합 섬유에 잔류하는 양이온성 폴리머를 제거하기 위해 세척한 후 글루타르알데하이드 용액(0.6mL GA/L, 1M NaOH 기반)에 넣어주어 37°C에서 4시간 동안 가교 반응을 진행하는 단계를 더 진행할 수 있다.
- [49]     상기 과정을 통해 제조된 본 발명의 키토산-바이오매스 복합체는 남세균을 효과적으로 제거(흡착)할 수 있으며, 바람직하게는 녹조를 유발하는 마이크로시스티스 에루지노사(*Microcystis aeruginosa*)를 제거할 수 있다.
- [50]     본 발명의 키토산-바이오매스 복합체는 천연 소재인 키토산 및 발효산업공정에서 발생하는 폐바이오매스를 활용하기 때문에 환경 친화적일 뿐 아니라, 복합 소재의 표면을 양이온성 고분자로 개질시킴으로써 다량의 아민기를 포함하는바, 음전하를 띄는 유해 남세균 세포를 효과적으로 흡착할 수 있다. 본 발명의 하기 실시예에서는, 다양한 녹조 수준에 따른 본 발명의 키토산-바이오매스 복합체의 녹조 제거 효율을 평가하였으며, 그 결과 저밀도, 중밀도 및 고밀도 조건에서도 남세균 제거 효과가 우수한 것으로 나타났다.
- [51]     한편, 남세균 제거(흡착) 용도를 갖는 본 발명의 키토산-바이오매스 복합체는 녹조가 발생된 수계에 적용하는 경우 수계의 2차 오염을 일으키지 않아야 하는바, 독성이 없어야 한다. 이에, 하기 실시예에서는 본 발명의 키토산-바이오매스 복합체의 생태독성을 살펴보았으며, 그 결과 독성이 거의 없는 것으로 확인되어, 실제 사용에 따른 수생생태계의 독성 등 각종 부정적 영향을 최소화시킬 수 있다.
- [52]     또한, 본 발명은 남세균 제거용 키토산-바이오매스 복합체를 녹조 발생 수역 또는 발생징후가 관찰된 수역에 처리하는 단계를 포함하는, 녹조 제거방법에

관한 것이다.

[53] 또한, 본 발명은 남세균 제거용 키토산-바이오매스 복합체를 녹조 발생 수역에 처리하여 남세균을 흡착시키는 단계; 및 남세균이 흡착된 키토산-바이오매스 복합체를 특정 농도의 염기성 용액에 첨가한 후 초음파를 처리하는 단계를 포함하는, 키토산-바이오매스 복합체로부터 남세균을 회수하는 방법에 관한 것이다.

[54] 본 발명의 하기 실시예에서는 0.1M 농도의 NaOH 용액 및 40kHz 초음파 처리를 통해 키토산-바이오매스 복합체로부터 남세균 세포를 파괴시키지 않으면서, 세포 구조를 잘 유지한채로 세포를 탈착시킬 수 있음을 확인하였으며, 이에, 본 발명의 탈착 과정을 통해 회수한 유해 남세균 세포의 경우 바이오 연료 등의 산업적 활용이 가능하다.

[55] 또한, 본 발명은 1) 남세균 제거용 키토산-바이오매스 복합체를 녹조 발생 수역에 처리하여 남세균을 흡착시키는 단계; 2) 남세균이 흡착된 키토산-바이오매스 복합체를 0.1M 의 NaOH 용액에 첨가한 후 40kHz 초음파를 처리하여 남세균을 탈착시키는 단계; 및 3) 남세균이 탈착된 키토산-바이오매스 복합체를 증류수를 이용하여 중성(pH 7)이 될 때까지 세척한 후 55~60°C에서 20~30시간 동안 건조시키는 단계를 포함하는, 남세균 제거용 키토산-바이오매스 복합체의 재생 방법에 관한 것이다.

[56] 본 발명의 하기 실시예에서는 상기 1) 내지 3) 단계를 통해 재생된 본 발명의 키토산-바이오매스 복합체가 재사용시에도 기능성을 잃지 않고 남세균을 효율적으로 흡착하는 것을 확인하였다. 이에, 본 발명의 키토산-바이오매스 복합체는 상기 과정을 통해 재생(재활용)이 가능한바, 친환경적이고 경제적인 소재로서 유용하게 사용될 수 있다.

[57]

[58] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

## 발명의 실시를 위한 형태

[59] <실시예>

[60]

[61] 1. 재료 및 방법

[62]

[63] <1-1> 재료 준비

[64] 키토산(저분자량, 50000 ~ 190000 Da, 탈아세틸화 키토) 및 분지형 폴리에틸렌이민(PEI, Mw 750000, 50% 함량)은 Sigma Aldrich, Inc.(서울, 한국)에서 구입하였다. L-페닐알라닌 발효 과정에서 생성된 페바이오매스인 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*)은 (주)대상 (Daesang

Co., Gunsan, Korea)에서 사멸처리 후 건조된 분말 형태로 제공받았다. 아세트산(>99.5%)은 대정화금 주식회사(한국, 시흥)에서 구입하였으며, 글루타르알데하이드(GA, 25wt%)는 Junsei Chemical Co., Ltd.(Tokyo, Japan)에서 구입하였다. 섬유형태의 흡착제 제조에는 방사용 니들 (Taeha Co., Seoul, Korea)이 이용되었다.

- [65] 타겟 오염물질인 마이크로시스티스 에루지노사(*M. aeruginosa* KW) 균주는 왕송저수지에서 동정된 것으로 한국생명공학연구원(Korea Institute of Bioscience and Biotechnology; KRIBB)의 안치용 박사님이 분양해 준 것을 사용하였다. *M. aeruginosa* 배양에는 BG11 배지가 사용되었으며, 상기 배지는 1L 3차 증류수에 하기 표 1에서 나타낸 구성성분을 첨가하여 제조되었다. 배지는 121°C에서 20분간 멸균을 한 후 사용하였다.

[66]

[67] [표1]

BG11 배지 조성

| 구성성분                                                     | 농도 (mg L <sup>-1</sup> ) |
|----------------------------------------------------------|--------------------------|
| NaNO <sub>3</sub>                                        | 1,500                    |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                          | 40                       |
| MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                     | 75                       |
| CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O                     | 36                       |
| Citric Acid·H <sub>2</sub> O                             | 6                        |
| Ferric Ammonium Citrate                                  | 6                        |
| Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O                   | 1                        |
| Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>                          | 20                       |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                           | 2.86                     |
| MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O                     | 1.81                     |
| ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                     | 0.22                     |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O      | 0.39                     |
| CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O                     | 0.079                    |
| Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O KCl | 0.0494                   |

[68]

[69] <1-2> 흡착제 제조

- [70] 키토산 기반 흡착제를 제조하기 위해 먼저 키토산 분말을 5% 아세트산 용액에 24시간 동안 교반하면서 용해시켜 키토산 용액(6%wt)을 제조하였다. 준비된 키토산 용액에 분말 상태의 코리네박테리움 글루타미쿰 바이오매스(<50 μm)

분말을 혼합하여 키토산/바이오매스 혼합용액(키토산:바이오매스=3:7 in suspension)을 제조하고 바이오매스가 균일하게 분산될 수 있도록 12시간 동안 교반하였다. 준비된 키토산 용액 및 키토산-바이오매스 용액을 방사용 니들을 통해 1M NaOH 용액에 방사하여 키토산 섬유(fabricate chitosan fiber, 이하 간략하게 'CF'라 약칭함) 및 키토산-바이오매스 복합 섬유(chitosan-biomass composite fiber, 이하 간략하게 'CBF'라 약칭함)를 제조하였다. 제조된 섬유를 1L의 글루타르알데하이드 용액(0.6mL GA/L, 1M NaOH 기반)에 침지시키고 가교 반응을 위해 300rpm에서 1시간 동안 교반하였다. 가교 반응 후 용액에서 CF와 CBF를 분리하고 증류수로 3회 세척하여 섬유에 잔류하는 NaOH와 글루타르알데하이드(GA)를 제거하였다.

[71] 세척 단계 후, 제조된 CBF는 폴리에틸렌이민(PEI)을 사용하여 개질하였다. 간단하게는, 25gwt의 CBF를 6시간 동안 37°C에서 1L의 PEI 용액(2% w/v)에 넣고 6시간 동안 반응시켰다. PEI 개질 후, 용액에서 PEI 개질된 키토산-바이오매스 복합 섬유(이하 간략하게 'PEI-CBF'라 약칭함)를 분리하고 잔류 PEI를 제거하기 위해 1회 세척한 다음, 1 L의 GA 용액(0.6mL GA/L, 1M NaOH 기반)에 넣어주어 37°C에서 4시간 동안 가교반응을 진행하였다. 가교반응이 완료된 후 흡착제를 용액과 분리하고 증류수를 사용하여 3회 세척해 주었다.

[72] 상기 과정을 통해 제조된 각각의 흡착제(CF, CBF, PEI-CBF)는 24시간 동안 동결건조를 진행하였고 건조된 흡착소재는 실험이 진행되는 동안 데시케이터에 보관하여 사용하였다.

[73]

[74] <1-3> *M. aeruginosa* 흡착 제거 평가

[75] 제조된 흡착제의 제거 효율을 확인하기 위하여 먼저 BG11 배지에서 0.15 L min<sup>-1</sup>의 공기주입속도, 50 µmol m<sup>-2</sup>의 광량 및 25°C의 조건에서 *M. aeruginosa*를 배양하였다. 우선 배양된 *M. aeruginosa*는 원심분리를 통하여 배지에서 분리하였다. 그 후, 150 mL 증류수와 혼합하여 *M. aeruginosa*의 초기 세포 밀도를 한국의 조류 정보 단계를 고려하여 5×10<sup>5</sup>, 5×10<sup>6</sup>, 1×10<sup>7</sup> cells/mL로 조정하였다. 이후, *M. aeruginosa*를 배양한 배지 샘플에 0.3g의 흡착제를 첨가하였다. *M. aeruginosa* 제거 시험에 있어서 흡착제(CF, CBF, PEI-CBF)를 사용하기 전에 모든 흡착제를 70% 에탄올로 멸균하고 UV 광이 있는 clean bench에서 몇 시간 동안 건조시켰다. 흡착제가 첨가된 시료는 24시간 동안 우선배양의 조건과 동일한 공기주입속도, 광량 및 온도의 조건에서 배양하였다. 정해진 시간 간격으로 샘플링을 진행하여 용액 내 존재하는 *M. aeruginosa* 세포의 수를 hemacytometer(Hausser Scientific, USA)를 이용하여 측정하였다. 모든 흡착 제거 평가는 3회 반복 실험을 진행하였다.

[76]

[77] <1-4> 흡착제의 표면 작용기의 특성 분석

[78] PEI 분자에 의해 개질된 흡착제 표면을 평가하기 위해 본 발명에서 제조된 흡착제의  $N_{1s}$  신호를 XPS 기기(X-TOOL, ULVAC-PHI, JAPAN)를 사용하여 측정하였다. 측정된  $N_{1s}$  신호는 XPS peak fitting software(XPSPEAK 4.1)를 사용하여 분석하였다.

[79]

[80] <1-5> 잔류 인(P) 검출 및 전계방출주사전자현미경(FE-SEM) 분석

[81] *M. aeruginosa* 제거 실험 중 *M. aeruginosa* 세포 배양 샘플의 인(P) 농도를 측정하여 HUMAS(Humas Co. Ltd., Korea) 키트를 사용하여 세포 성장 경향을 비교하였다. *M. aeruginosa* 제거 실험 후 CBF 및 PEI-CBF 흡착제의 표면 변화를 확인하기 위하여 FE-SEM(Cary 630 FT-IR, Agilent, USA) 분석을 수행하였다. CBF 및 PEI-CBF(*M. aeruginosa* 제거 실험 전·후)는 동결건조하였다. 동결건조된 CBF와 PEI-CBF에 4 nm 백금 필름을 코팅하고 60초 동안 진공 챔버에 두었다. 그런 다음, 코팅된 CBF와 PEI-CBF를 FE-SEM(Horiba S-4700, Japan)을 사용하여 스캔하여 소재의 표면을 관찰하였다.

[82]

[83] <1-6> 흡착제의 생태독성 평가

[84] PEI-CBF의 독성을 평가하기 위하여 EPA(Environmental Protection Agency) 지침에 따라 독성 테스트를 수행하였다. 태어난지 24시간이 경과되지 않은 *Daphnia magna* 개체 5마리를 이용하였다. PEI-CBF(0.02g)를 시험 용기에 혼합하고 광주기 조건(명: 16시간, 암: 8시간)에서 20°C에서 48시간 동안 배양하였다. 독성 평가의 흡착제 농도는 세포 제거 실험과 동일하였다. PEI-CBF 없이 배양된 *D. magna* 샘플을 대조군으로 설정하였다. *D. magna*의 생존율을 배양 24시간 및 48시간에 기록하였다. 독성 평가는 일정한 조건에서 4회 반복하였다.

[85]

[86] <1-7> 흡착제로부터 *M. aeruginosa*의 회수를 위한 초음파 및 NaOH 처리 조건

[87] [초음파 세기 조건 변경]

[88] *M. aeruginosa* 세포가 부착된 PEI-CBF 흡착제로부터 초음파 세기에 따른 탈착 효율을 확인하기 위하여 0.01M NaOH 조건 하에서 초음파 처리 세기를 다양하게 진행하여 30분 후 탈착 효율을 검증하였다. 자세하게는, 500mL의 Tall beaker에 *M. aeruginosa* 세포가 부착된 PEI-CBF 흡착제 0.3g과 150mL의 0.01M NaOH 용액(150 mL)을 혼합한 뒤 초음파 세척기(SD-200H, 한국)를 이용하여 10, 20, 40 및 80 kHz 초음파를 30분 동안 처리하는 과정을 통해 세포 탈착을 진행하였다. 초음파 처리에 의한 시료의 온도 상승을 방지하기 위하여 초음파 세척기의 충진제로 얼음물을 사용하였다.

[89] [NaOH 농도 조건 변경]

[90] *M. aeruginosa* 세포가 부착된 PEI-CBF 흡착제로부터 NaOH 처리 농도에 따른 탈착 효율을 확인하기 위하여 40kHz 초음파 처리 조건 하에서 NaOH 용액의

농도를 상이하게 처리하여 탈착 효율을 검증하였다. 자세하게는, 500mL의 Tall beaker에 *M. aeruginosa* 세포가 부착된 PEI-CBF 흡착제 0.3g과 150mL의 0.001M, 0.01M, 0.1M 및 1M 농도의 NaOH 용액(150 mL)을 혼합한 뒤 초음파 세척기(SD-200H, 한국)를 이용하여 40 kHz 초음파를 30분 동안 처리하는 과정을 통해 세포 탈착을 진행하였다. 초음파 처리에 의한 시료의 온도 상승을 방지하기 위하여 초음파 세척기의 충전제로 얼음물을 사용하였다.

[91]

[92] <1-8> 흡착제로부터 *M. aeruginosa*의 회수 및 흡착제의 재사용[93] [흡착제로부터 *M. aeruginosa*를 회수]

[94] *M. aeruginosa* 세포가 부착된 흡착제로부터 *M. aeruginosa*를 회수하기 위하여 특정 농도의 염기성 용액(0.1M NaOH) 및 초음파를 이용하여 탈착을 진행하였다. 자세하게는, 500mL의 Tall beaker에 *M. aeruginosa* 세포가 부착된 흡착제 0.3g과 150mL의 0.1M NaOH 용액(150 mL)을 혼합한 뒤 초음파 세척기(SD-200H, 한국)를 이용하여 40kHz 초음파를 30분 동안 처리하는 과정을 통해 세포 탈착을 진행하였다. 초음파 처리에 의한 시료의 온도 상승을 방지하기 위하여 초음파 세척기의 충전제로 얼음물을 사용하였다. 회수한 *M. aeruginosa* 세포의 변화를 현미경을 이용하여 관찰하였다.

[95] [흡착제의 재생 및 재사용]

[96] *M. aeruginosa* 세포를 회수한 후 처리된 흡착제를 3차 증류수로 수소이온농도가 중성(pH 7)이 될 때까지 세척을 진행하였다. 세척과정을 마친 흡착제는 60°C에서 24시간 동안 건조시킨 후 재사용하였다.

[97]

[98] <1-9> 흡착제로부터 회수한 *M. aeruginosa*의 총 지질 함량 측정

[99] 흡착제로부터 회수된 *M. aeruginosa* 세포의 산업적 활용 가능성을 확인하기 위해 기존 회수법으로서 원심분리법을 이용한 대조군과 본 발명의 염기성 용액 및 초음파 처리를 통해 탈착 과정을 진행한 실험군의 총 지질 함량 변화를 측정하였다.

[100] *M. aeruginosa* 세포에서 총 지질을 추출 방법은 Folch et al이 제안한 방법을 사용하였다(Folch, Jordi, Mark Lees, and GH Sloane Stanley. "A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues." Journal of biological chemistry 226.1 (1957): 497-509.). 간략하게는, 총 지질을 추출하기 전에 0.45 $\mu$ m 유리 섬유 필터(Whatman, USA)를 사용하여 시료 여과를 통해 회수된 *M. aeruginosa*의 건조 중량을 측정하였다. 여과된 샘플을 60°C에서 일정한 중량으로 건조시켰다. 전체 지질 추출 과정에서 회전 증발기를 사용하여 나머지 용매를 증발시켜 추출된 지질을 얻었다. 흡착제로부터 회수한 *M. aeruginosa*의 총 지질과 같은 농도의 회수된 *M. aeruginosa* (대조군)의 총 지질을 중량측정으로 측정하였다. 총 지질을 측정한 후, 세포의 총 지질 함량을 건조 중량 백분율로 계산하였다.

[101]

[102] 2. 결과

[103]

[104] <2-1> 흡착제의 *M. aeruginosa* 제거 성능 비교

[105] 제거 대상인 *M. aeruginosa* 세포는 음이온성 작용기로 인해 수상에서 음전하를 띠 수 있다. 따라서 음전하를 띠는 세포는 흡착제의 양성 결합 부위에 정전기적으로 결합될 수 있으므로 흡착제에 있는 양성 작용기의 수는 흡착제의 흡착 제거 능력을 나타내는 중요한 인자이다.

[106] 흡착제의 종류에 따른 *M. aeruginosa* 제거 효율은 도 1A에서 자세히 나타내었다. CF 흡착제는 처리 12시간에서  $61.7 \pm 1.6\%$ 의 세포 제거 효율을 보여주었으나, CBF 흡착제의 경우 키토산의 구성성분에도 불구하고 *M. aeruginosa* 세포 제거 효율이  $22.7 \pm 3.6\%$ 로 나타나 CF 흡착제에 비해 흡착 효율이 현저히 떨어지는 것으로 나타났다. CBF 흡착제의 또 다른 구성성분인 코리네박테리움 글루타미쿰 바이오매스에 있는 음이온성 작용기(예: 카르복실 및 포스포네이트기)는 녹조 제거 테스트의 pH 조건(pH 7 - 8)에서 pKa 특성(카르복실 pKa: 3-5, 포스포네이트 pKa: 약 6.5)에 따라 탈양성자화 반응에 의해 음성적으로 활성화될 수 있다. 바이오매스의 음으로 하전된 부위는 CBF 흡착제의 키토산 기질에 있는 양성 부위의 중화를 유발할 수 있다. 더욱이, 이러한 음의 작용기는 음이온 부위와 세포 표면 사이의 정전기적 반발로 인해 음전하를 띠는 세포 흡착을 방해할 수 있다.

[107] 그러나 PEI-CBF 흡착제의 경우 PEI 개질로 인해 *M. aeruginosa* 세포 제거율이  $83.7 \pm 0.8\%$ 로 급격히 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 상기와 같은 결과는 PEI 분자에 CBF의 음의 작용기를 정전기적으로 코팅하여 CBF에 비해 PEI-CBF에 많은 아민기가 도입되었음을 나타내는 것이다(도 1B 참조).

[108] PEI 개질에 의해 강화된 아민 그룹은 CBF 흡착제와 PEI-CBF 흡착제의 XPS  $N_{1s}$  신호를 비교하여 결정할 수 있다(도 2 참조). CBF 흡착제의 XPS  $N_{1s}$  신호는 398.9 eV에서 강한 피크를 보여 키토산 기질의  $-NH_2$ 에 할당되었다. PEI-CBF 흡착제의  $N_{1s}$  신호는 키토산 기질의 아민기 피크(398.7 eV)뿐만 아니라 개질된 PEI 분자의 아민기와 관련된 피크(399.9 eV:  $-NH-$  및 401.5 eV:  $-NH_3^+$ )를 나타내었다. 또한, 하기 표 2에서 나타낸 바와 같이, PEI-CBF(2021.9)의 전체  $N_{1s}$  신호 면적이 CBF(1295.3) 대비 매우 증대되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 새로운 피크의 출현과 증가된 신호 영역은 PEI-CBF 흡착제가 CBF 흡착제에 비해 마이크로시스티스 에루지노사에 대해 더 많은 수의 양성 결합 부위를 보유함을 나타내는 것이다. 한편, 대조군 및 CBF 흡착제 처리된 샘플에 비해 PEI-CBF 흡착제 처리된 샘플에서 더 낮은 인(P) 소비는 PEI-CBF 흡착제에서 세포 제거 효율이 증가한 것을 뒷받침하는 것이다(도 3 참조). 또한, 이는 PEI-CBF 흡착제에 흡착된 *M. aeruginosa* 세포가 생물학적 활성을 상실함을 의미하는 것이다.

[109] *M. aeruginosa*의 성장을 제어하기 위해 PEI-CBF 흡착제를 수계에 적용하는

경우 수계의 2차 오염을 방지하기 위해 PEI-CBF 흡착제의 독성이 없어야 한다. 물벼룩(*D. magna*)을 이용하여 상기 흡착제의 독성을 평가한 결과, PEI-CBF 흡착제의 생태독성은 무시할만한 수준임을 확인하였다(도 4 참조).

[110]

[111] [표2]

CBF 및 PEI-CBF에 대한 N<sub>1s</sub> XPS 피크의 특성

| Peak position (eV) | Assignment                         | Peak area |         |
|--------------------|------------------------------------|-----------|---------|
|                    |                                    | CBF       | PEI-CBF |
| 398.7 - 398.9      | -NH <sub>2</sub>                   | 1295.3    | 885.3   |
| 399.9              | -NH-                               | -         | 992.8   |
| 401.5              | N-H, -NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> | -         | 143.8   |
| Total area         |                                    | 1295.3    | 2021.9  |

[112]

[113] **<2-2> 다양한 녹조 수준에 따른 PEI-CBF 흡착제의 녹조 제거 효과**

[114] 녹조현상 발생 시 우점종인 *M. aeruginosa*와 같은 남조류의 농도에 따라 녹조 경보 단계를 달리하고 있다. 따라서 다양한 녹조 수준에서의 적용 가능성을 확인하기 위해 다양한 *M. aeruginosa*의 밀도에서 PEI-CBF의 흡착제로서의 효율을 평가하였다. PEI-CBF 흡착제는 낮은 *M. aeruginosa* 밀도(초기 농도:  $5 \times 10^5$  cells/mL)에서  $89.0 \pm 1.22\%$  제거능을 보여주었다(도 5a 참조). 또한, *M. aeruginosa*의 중밀도(초기 농도:  $5 \times 10^6$  cells/mL) 및 고밀도(초기 농도:  $1 \times 10^7$  cells/mL) 조건에서 PEI-CBF 흡착제는 각각  $89.7 \pm 2.35\%$  및  $91.1 \pm 0.66\%$ 의 제거율을 보여주었다(도 5b 및 5c 참조). 상기와 같은 결과를 통해, 본 발명의 PEI-CBF 흡착제는 다양한 조류 발생 수준에서 남조류 제거 효과가 우수함을 확인할 수 있었다.

[115]

[116] [표3]

PEI-CBF 흡착제 사용 후 시간 경과에 따른 *M. aeruginosa*의 세포 밀도(cells/mL)

| 남조류<br>밀도 | 처리군     | 시간(hr)          |                     |                     |                     |                     |
|-----------|---------|-----------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
|           |         | 0               | 4                   | 8                   | 12                  | 24                  |
| 저밀도       | Control | $5 \times 10^5$ | $6.2 \times 10^5$   | $7.1 \times 10^5$   | $8.5 \times 10^5$   | $10.8 \times 10^5$  |
|           | PEI-CBF | $5 \times 10^5$ | $1.4 \times 10^5$   | $1.2 \times 10^5$   | $0.82 \times 10^5$  | $0.55 \times 10^5$  |
| 중밀도       | Control | $5 \times 10^6$ | $5.92 \times 10^6$  | $6.05 \times 10^6$  | $6.36 \times 10^6$  | $7.00 \times 10^6$  |
|           | PEI-CBF | $5 \times 10^6$ | $1.16 \times 10^6$  | $0.86 \times 10^6$  | $0.61 \times 10^6$  | $0.51 \times 10^6$  |
| 고밀도       | Control | $1 \times 10^7$ | $1.181 \times 10^7$ | $1.225 \times 10^7$ | $1.304 \times 10^7$ | $1.476 \times 10^7$ |
|           | PEI-CBF | $1 \times 10^7$ | $0.305 \times 10^7$ | $0.100 \times 10^7$ | $0.091 \times 10^7$ | $0.089 \times 10^7$ |

[117]

[118] <2-3> 흡착제로부터 *M. aeruginosa*의 회수를 위한 최적의 초음파 및 NaOH 처리 조건

[119] 탈착 진행 시 초음파 세기에 따른 탈착 효율을 확인한 결과, 40kHz 조건 및 그 이상의 조건의 초음파 처리 시 제거 효율이 우수함을 확인할 수 있었으며, 에너지 소모량 등을 전반적으로 고려하여 40kHz 조건을 최적의 처리 조건으로 선정하였다(도 6 및 표 4 참조).

[120] 또한, 40kHz 초음파 처리 조건 하에서 NaOH 용액의 농도를 상이하게 처리하여 탈착 효율을 확인한 결과, 0.1M NaOH와 1M NaOH 조건 하의 처리 군에서 탈착 효율이 가장 뛰어남을 확인하였다. 따라서 탈착 진행 시 최적의 NaOH 처리 농도를 0.1M NaOH로 선정하였다(도 7 및 표 5 참조).

[121]

[122] [표4]

0.01M NaOH 조건 하에서의 초음파 처리 세기에 따른 탈착 효율

| 비교      | 10kHz | 20kHz | 40kHz | 80kHz |
|---------|-------|-------|-------|-------|
| 탈착율 (%) | 12.13 | 25.63 | 48.22 | 48.33 |

[123]

[124] [표5]

40kHz 초음파 처리 시 NaOH 농도에 따른 탈착 효율

| 비교      | 0.001M NaOH | 0.01M NaOH | 0.1M NaOH | 1M NaOH |
|---------|-------------|------------|-----------|---------|
| 탈착율 (%) | 24.92       | 48.22      | 95.27     | 95.27   |

[125]

[126] <2-4> 흡착제에 의해 회수한 *M. aeruginosa*의 산업적 활용 가능성

- [127] *M. aeruginosa*의 세포 밀도가  $(1009.2 \pm 1.0) \times 10^4$  cells/mL에 해당하는 수성 배지에 PEI-CBF 흡착제를 적용한 결과, 최종 세포 밀도가  $(89.2 \pm 10.7) \times 10^4$  cells/mL로 나타나 상기 흡착제에 의한 남세균의 제거율이  $91.2 \pm 0.9\%$ 로 나타났다. PEI-CBF 흡착제를 이용하여 유해 남조류인 *M. aeruginosa*를 직접 제어함으로써 PEI-CBF 흡착제의 표면의 색깔이 녹색으로 변화되는 것으로 나타났으며(도 8 참조), FE-SEM을 이용한 표면 관찰을 통해서도 PEI-CBF 흡착제의 표면 변화를 확인할 수 있었다(도 9 참조).
- [128] 한편, PEI-CBF 흡착제에 부착된 *M. aeruginosa*를 회수하기 위해 알칼리 용액과 초음파를 이용한 탈착 기술을 적용한 결과, *M. aeruginosa* 세포를  $95.3 \pm 0.8\%$ (탈착 세포 밀도:  $(876.7 \pm 3.0) \times 10^4$  cells/mL) 회수할 수 있었다.
- [129] 또한, 본 발명의 흡착-탈착 과정을 통해 *M. aeruginosa* 세포를 회수하는 방법이 회수한 세포의 지질 함량에 유의한 영향을 미치지 않음을 확인하였다. 흡착-탈착 과정에 의해 회수된 *M. aeruginosa* 세포의 총 지질 함량은  $18.5 \pm 0.5\% \text{wt}$ 로 측정되어, 대조군  $20.2 \pm 0.3\% \text{wt}$  대비 다소 낮게 나타났으나, 유의미한 수준은 아니었다(도 10 참조). 죽은 세포를 선택적으로 노출시킬 수 있는 수확된 세포의 트리판 블루 염색을 이용한 현미경 관찰을 통해 탈착된 샘플에서 일부 파괴되고 죽은 세포(어두운 점)를 발견하였다(도 11 참조). 이에, 흡착 후 회수된 세포의 지질 함량이 약간 감소한 결과는 세포 용해로 인한 지질 손실 또는 탈착 과정에서 일부 세포의 파괴로 인한 것일 수 있음을 유추할 수 있었다. 그러나 회수된 대부분의 세포는 여전히 세포 구조를 잘 유지하고 있는 것으로 나타났다. 이러한 결과를 통해, 본 발명의 탈착 과정을 통해 회수한 유해 남세균 세포를 이용하여 산업적 활용(바이오 연료, 바이오 에너지 등)이 가능함을 확인할 수 있었다.
- [130] 또한, 탈착 과정에 의해 재생된 PEI-CBF 흡착제의 경우 *M. aeruginosa*에 대한 제거 효율은 거의 일정하게 유지되는 것을 확인하였다(도 12 참조). 이를 통해, 본 발명의 PEI-CBF 흡착제는 탈착 과정을 통해 재사용이 가능하며 재사용시에도 기능성을 잃지 않고 *M. aeruginosa*를 효율적으로 흡착할 수 있음을 입증하였다.
- [131] 따라서 본 발명의 PEI-CBF 흡착제는 유해한 조류 발생 환경에서 *M. aeruginosa*를 효과적으로 제거(흡착)할 수 있으며, 재활용이 가능한바 친환경적이고 경제적인 소재로서 유용하게 사용될 수 있다.

[132]

[133] [표6]

본 발명의 탈착 방법을 통해 회수한 *M. aeruginosa*의 총 지질 함량

| 비교      | 기존 회수법(원심분리법) | 본 발명의 탈착 방법 |
|---------|---------------|-------------|
| 총 지질 함량 | 20.1789       | 18.5114     |

[134]

[135] [표7]

PEI-CBF 흡착제의 1차 및 2차 사용에 따른 *M. aeruginosa*의 제거 효율

| 비교                           | 1차 사용 | 2차 사용 |
|------------------------------|-------|-------|
| <i>M. aeruginosa</i> 의 제거 효율 | 89.73 | 88.77 |

[136]

[137] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

## 청구범위

- [청구항 1] 표면이 양이온성 폴리머로 개질된 남세균 제거용 키토산-바이오매스 복합체.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,  
상기 양이온성 폴리머는 아민기-함유 양이온성 폴리머인 것을 특징으로 하는, 남세균 제거용 키토산-바이오매스 복합체.
- [청구항 3] 제2항에 있어서,  
상기 아민기-함유 양이온성 폴리머는 폴리에틸렌이민,  
아민-터미네이티드 폴리에틸렌옥사이드, 아민-터미네이티드 폴리에틸렌/프로필렌 옥사이드, 디메틸 아미노 에틸 메타크릴레이트의 폴리머 및 디메틸 아미노에틸 메타크릴레이트와 비닐피롤리돈의 코폴리머, 에피클로로히드린과 디메틸아민의 선형 폴리머,  
폴리디알릴디메틸암모니움 클로라이드,  
폴리에탄올아민/메틸클로라이드 및 개질된 폴리에틸렌이민으로 구성되는 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는, 남세균 제거용 키토산-바이오매스 복합체.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,  
상기 바이오매스는 코리네박테리움 글루타미쿰인 것을 특징으로 하는, 남세균 제거용 키토산-바이오매스 복합체.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,  
상기 남세균 제거용 키토산-바이오매스 복합체는 a) 키토산 용액을 준비하는 단계; b) 키토산 용액에 바이오매스 분말을 혼합하여 키토산-바이오매스 혼합용액을 제조하는 단계; c) 상기 혼합용액을 방사하여 키토산-바이오매스 복합 섬유를 제조하는 단계; d) 상기 복합 섬유를 글루타르알데하이드 용액에 넣은 후 가교 반응을 진행시키는 단계; 및 e) 가교 반응이 진행된 복합 섬유를 양이온성 폴리머 용액에 넣고 반응시켜 복합 섬유의 표면을 개질시키는 단계를 포함하는 과정을 통해 제조되는 것을 특징으로 하는, 남세균 제거용 키토산-바이오매스 복합체.
- [청구항 6] 제5항에 있어서,  
상기 e) 단계에서 양이온성 폴리머는 폴리에틸렌이민인 것을 특징으로 하는 남세균 제거용 키토산-바이오매스 복합체.
- [청구항 7] 제1항에 있어서,  
상기 남세균은 녹조를 유발하는 마이크로시스티스 에루지노사(*Microcystis aeruginosa*)인 것을 특징으로 하는, 남세균 제거용 키토산-바이오매스 복합체.
- [청구항 8] 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 남세균 제거용 키토산-바이오매스 복합체를 녹조 발생 수역 또는 발생징후가 관찰된 수역에 처리하는

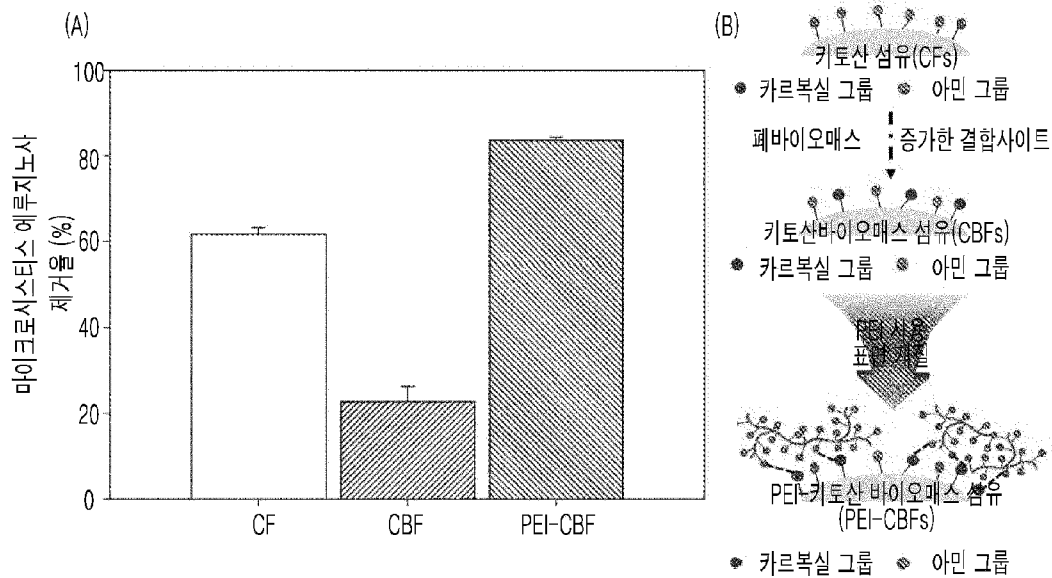
단계를 포함하는, 녹조 제거방법.

[청구항 9] 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 남세균 제거용 키토산-바이오매스 복합체를 녹조 발생 수역에 처리하여 남세균을 흡착시키는 단계; 및 남세균이 흡착된 키토산-바이오매스 복합체를 0.1M의 NaOH 용액에 첨가한 후 40kHz 초음파를 처리하는 단계를 포함하는, 키토산-바이오매스 복합체로부터 남세균을 회수하는 방법.

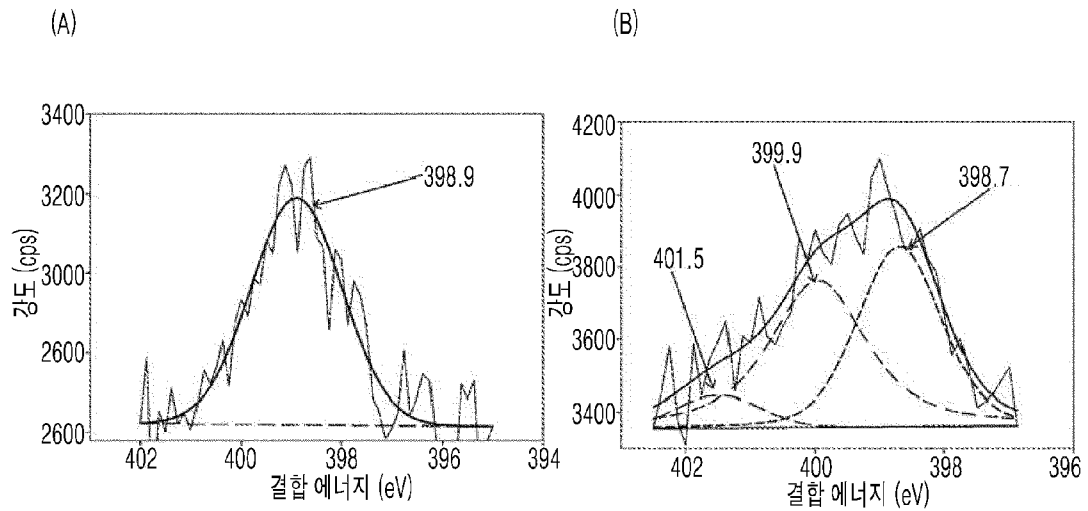
[청구항 10] 1) 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 남세균 제거용 키토산-바이오매스 복합체를 녹조 발생 수역에 처리하여 남세균을 흡착시키는 단계;  
2) 남세균이 흡착된 키토산-바이오매스 복합체를 0.1M의 NaOH 용액에 첨가한 후 40kHz 초음파를 처리하여 남세균을 탈착시키는 단계; 및  
3) 남세균이 탈착된 키토산-바이오매스 복합체를 증류수를 이용하여 중성(pH 7)이 될 때까지 세척한 후 55~60°C에서 20~30시간 동안 건조시키는 단계를 포함하는, 남세균 제거용 키토산-바이오매스 복합체의 재생 방법.

1/7

[도 1]

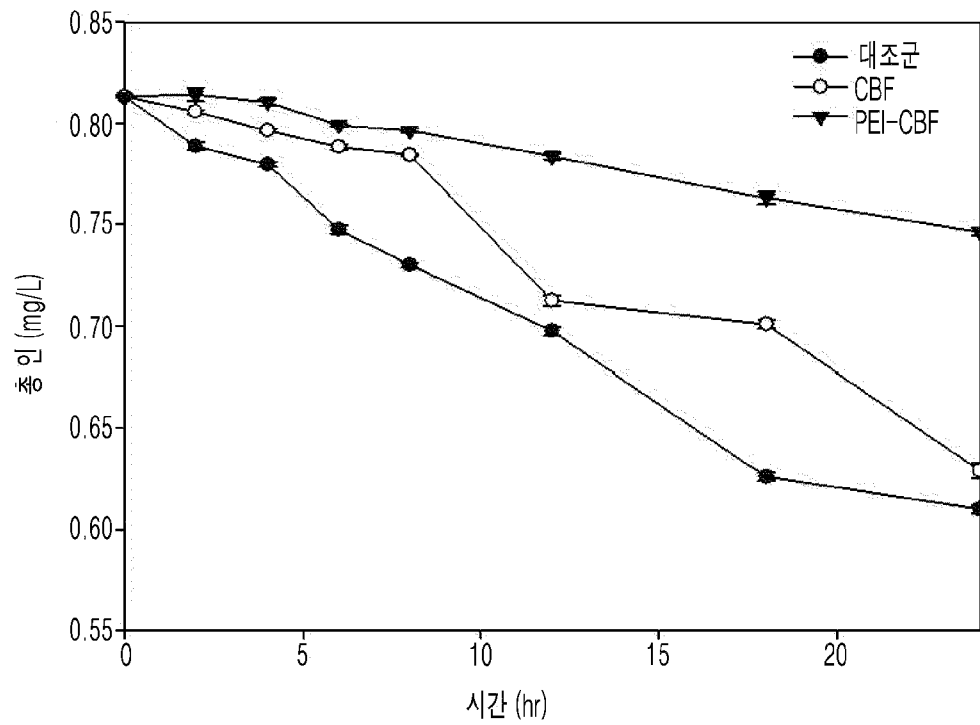


[도 2]

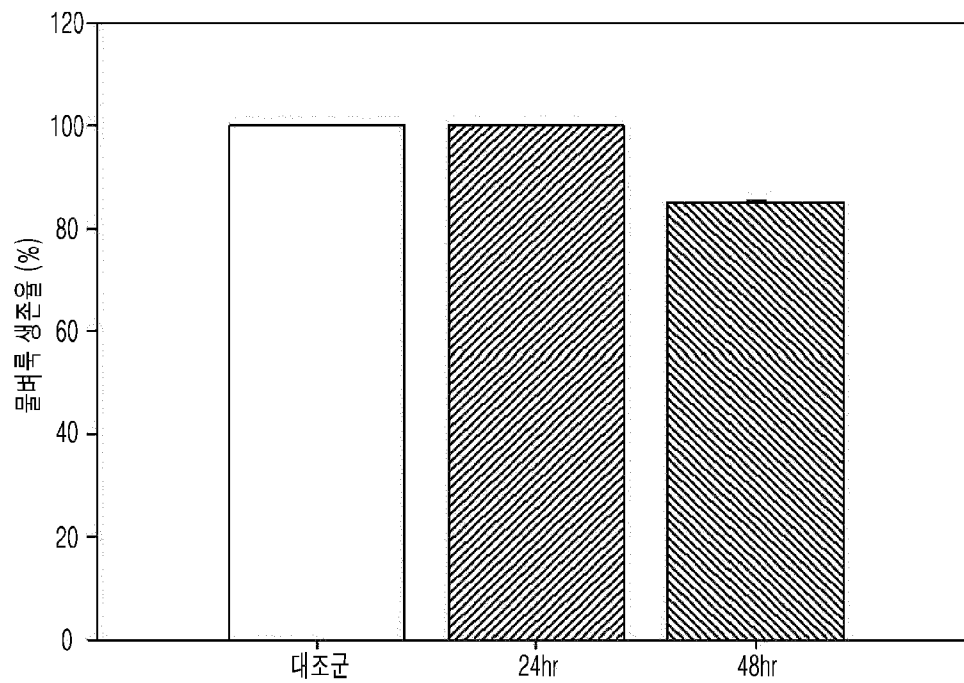


2/7

[도 3]

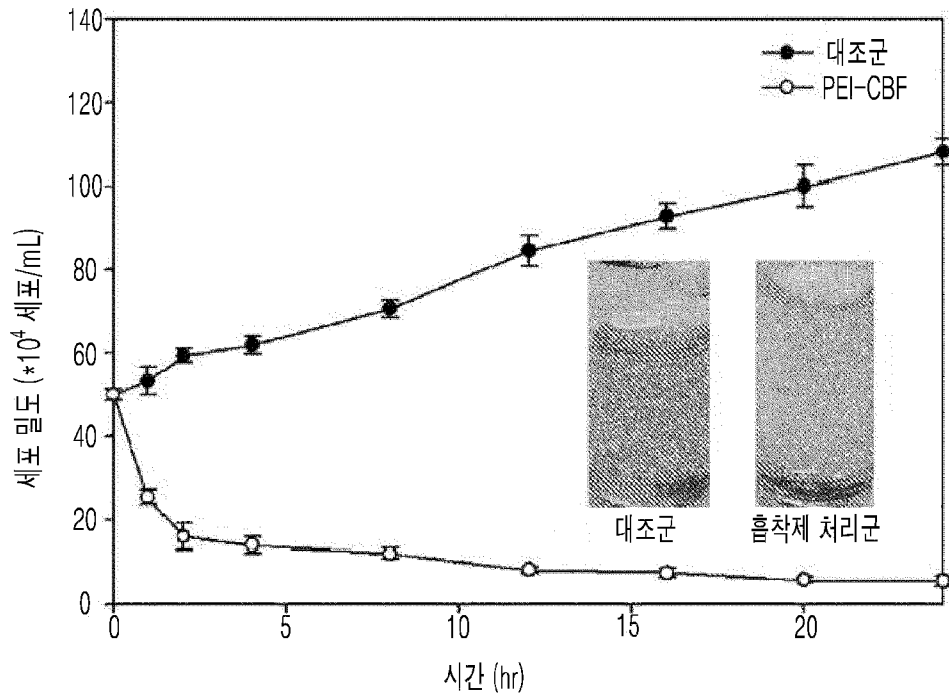


[도 4]

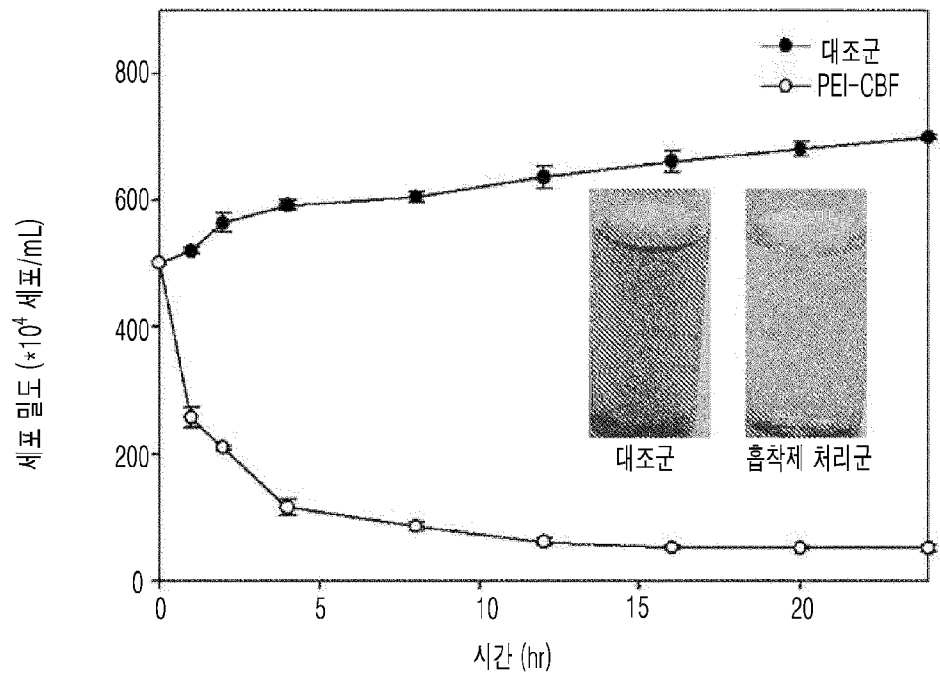


3/7

[도 5a]

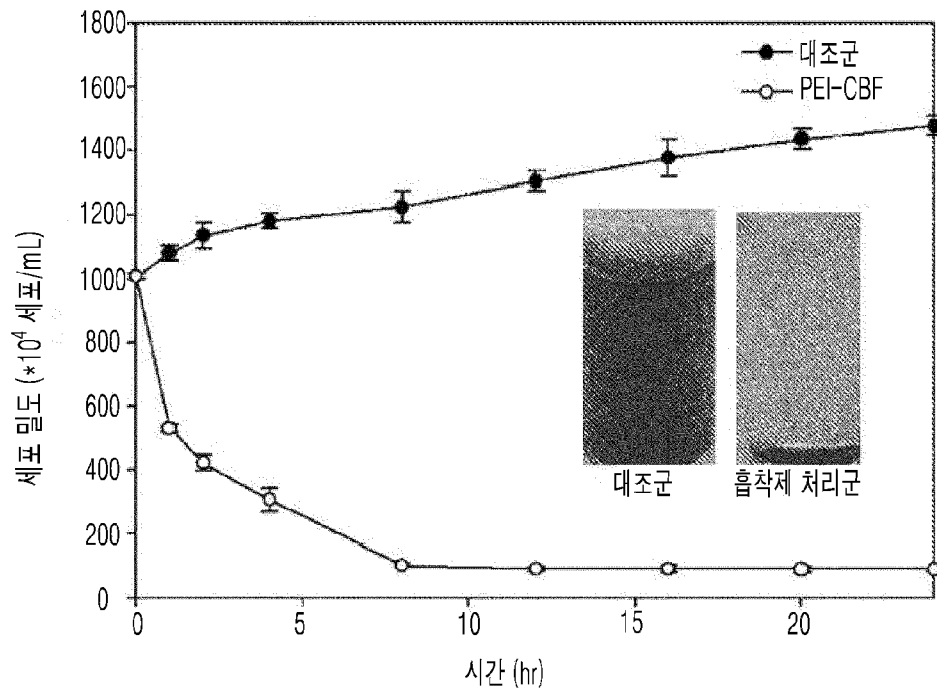


[도 5b]

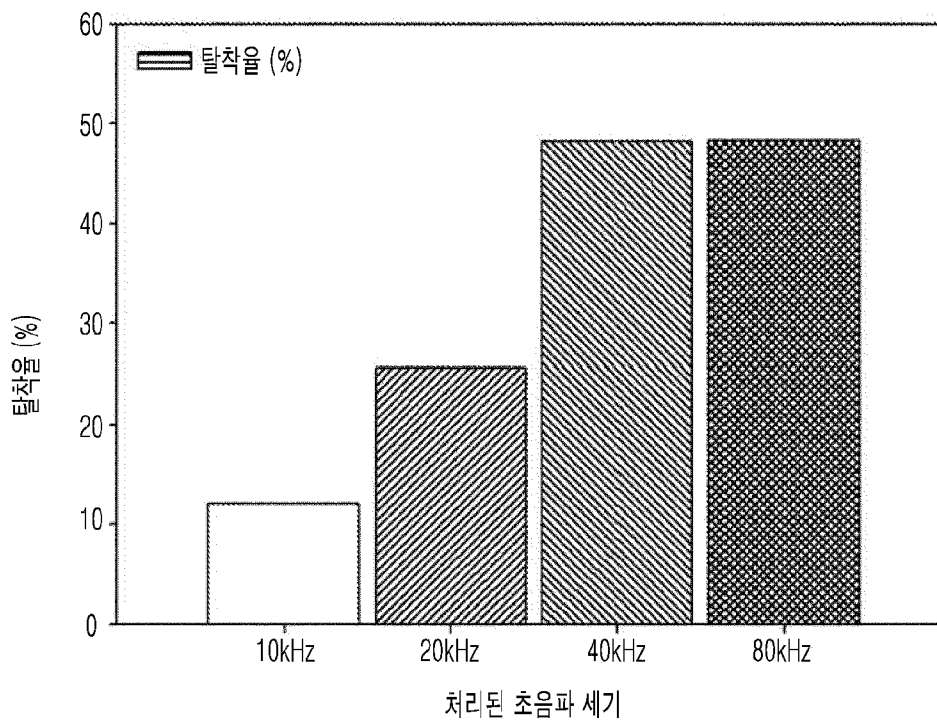


4/7

[도 5c]

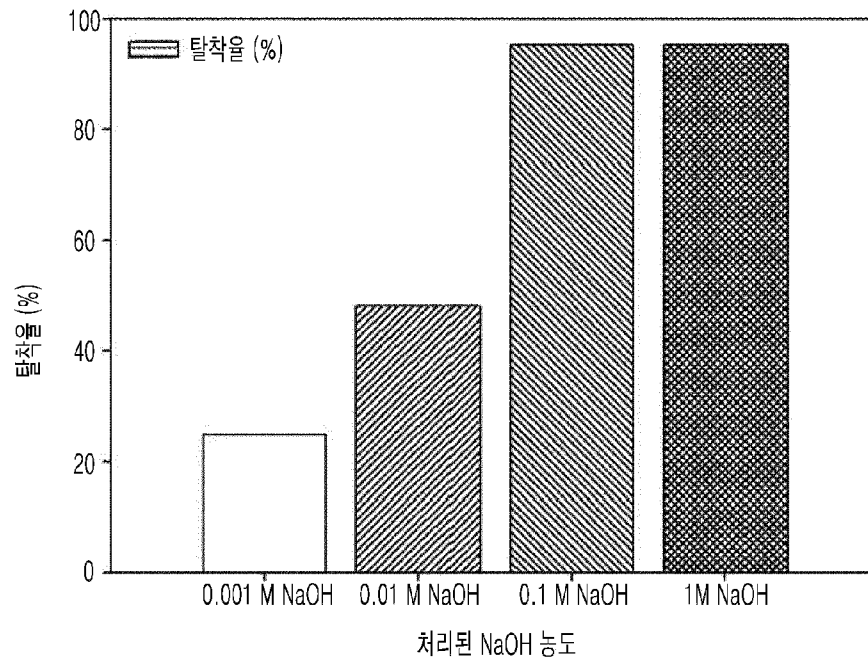


[도 6]

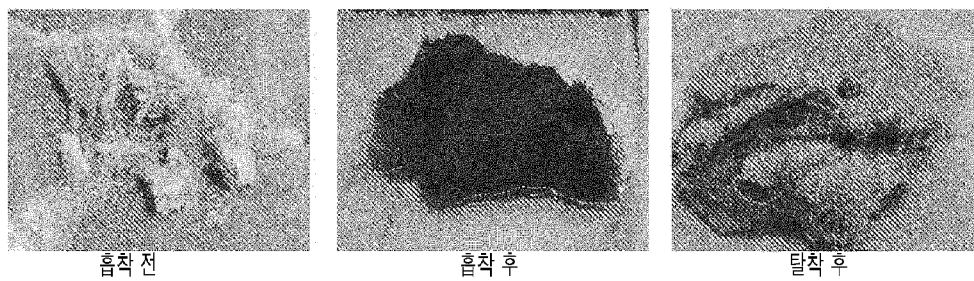


5/7

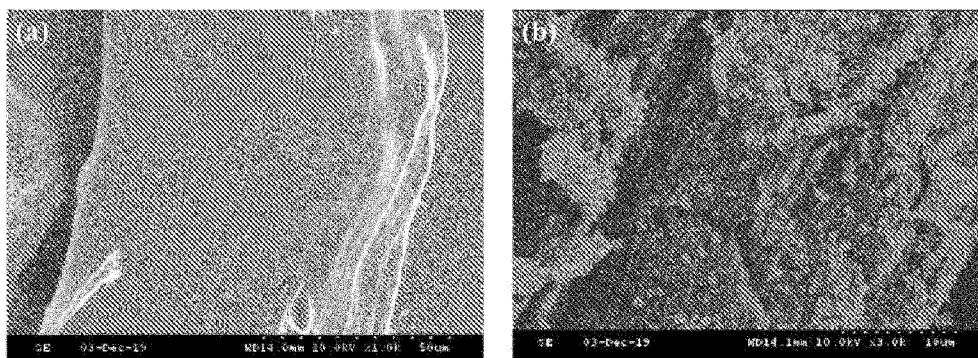
[도 7]



[도 8]

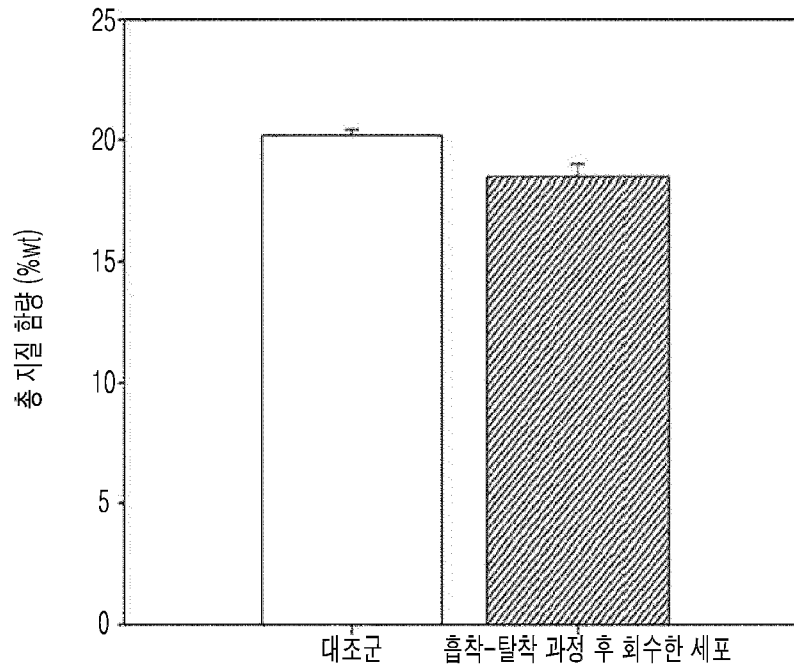


[도 9]

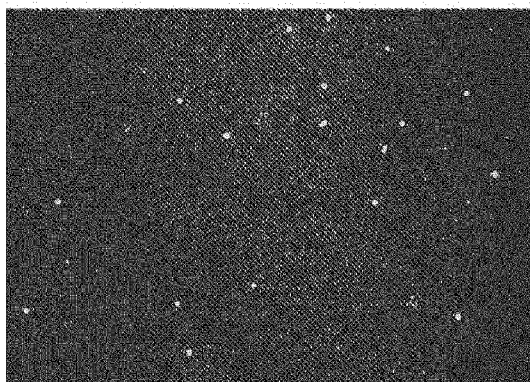


6/7

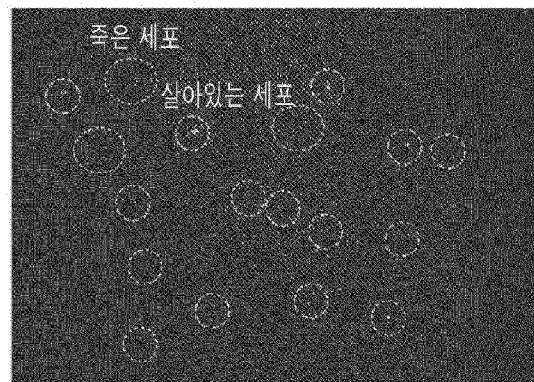
[도 10]



[도 11]



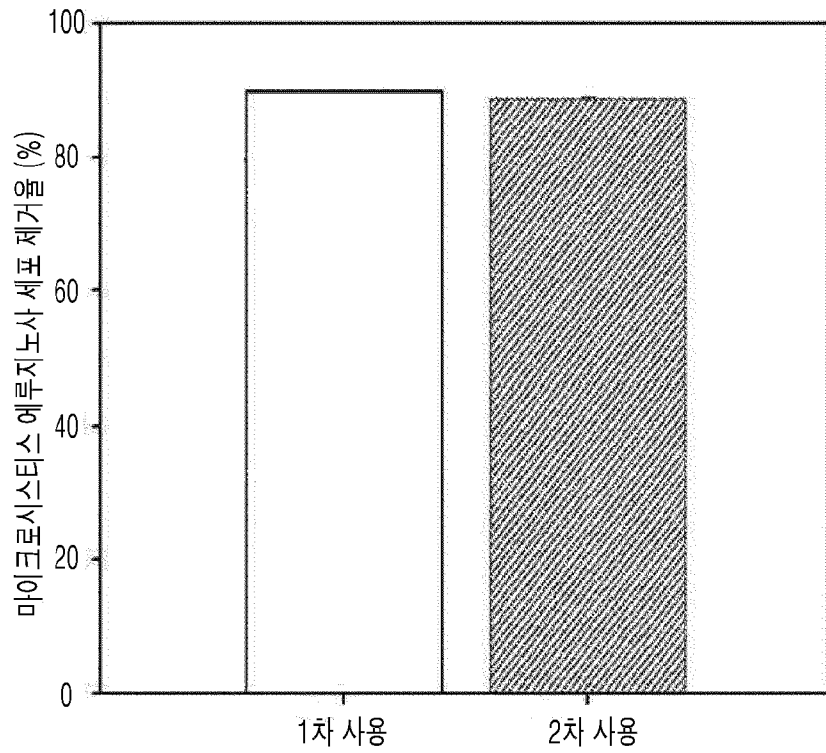
원심분리에 의해 회수한  
마이크로시스틱스 에루지노사 세포



흡착제를 이용하여 흡착-탈착 과정 후  
회수한 마이크로시스틱스 에루지노사 세포

7/7

[도 12]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/017346

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

A01N 43/16(2006.01)i; A01N 63/20(2020.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A01N 43/16(2006.01); C02F 1/28(2006.01); C02F 1/40(2006.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above

Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) &amp; keywords: 키토산(chitosan), 폴리에틸렌이민(polyethyleneimine), 복합체(composite), 코리네박테리움 글루타미쿰(corynebacterium glutamicum), 남세균(cyanobacteria), 마이크로시스티스 에루지노사(Microcystis aeruginosa), 녹조(water bloom), 회수(recovery), 재생(regeneration)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Relevant to claim No. |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Y         | WON, S. W. et al. The role of biomass in polyethylenimine-coated chitosan/bacterial biomass composite biosorbent fiber for removal of Ru from acetic acid waste solution. Bioresource Technology. 29 January 2014 (electronic publication), vol. 160, pp. 93-97.<br>See abstract; and page 94, left column.                                                                                      | 1-10                  |
| Y         | 김호선 등. 양이온성 고분자(polyethylenimine)가 코팅된 알지네이트/폐바이오매스 복합 흡착 소재를 사용한 유해 미세조류 Microcystis aeruginosa의 제거. Korean Journal of Environmental Biology (환경 생물). 31 December 2019, vol. 37, no. 4, pp. 741-748 (KIM, Hoseon et al. Removal of Microcystis aeruginosa using polyethylenimine-coated alginate/waste biomass composite biosorbent. Environmentalbiology.)<br>See abstract; and pages 743-745. | 1-10                  |
| Y         | YAASHIKAA, P. R. et al. Advances in biosorbents for removal of environmental pollutants: A review on pretreatment, removal mechanism and future outlook. Journal of Hazardous Materials. 06 July 2021 (electronic publication), document no. 126596, pp. 1-17.<br>See page 9, right column - page 12, left column.                                                                               | 9-10                  |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“D” document cited by the applicant in the international application

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

09 February 2023

Date of mailing of the international search report

10 February 2023

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office  
Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/KR2022/017346**

| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                       |
|-----------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Category*                                     | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | Relevant to claim No. |
| A                                             | KR 10-2019-0133943 A (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) 04 December 2019 (2019-12-04)<br>See entire document.                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 1-10                  |
| X                                             | PARK, Y. H. et al. Direct removal of harmful cyanobacterial species by adsorption process and their potential use as a lipid source. Chemical Engineering Journal. 12 August 2021 (electronic publication), vol. 427, document no. 131727, pp. 1-5.<br>See entire document.<br>* Known document declaring exceptions to lack of novelty by the applicant.                                                                  | 1-10                  |
| X                                             | KIM, H. S. et al. Amination of cotton fiber using polyethyleneimine and its application as an adsorbent to directly remove a harmful cyanobacterial species, Microcystis aeruginosa, from an aqueous medium. Environmental Research. 29 April 2021 (electronic publication), vol. 197, document no. 111235, pp. 1-8.<br>See entire document.<br>* Known document declaring exceptions to lack of novelty by the applicant. | 1-8                   |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/KR2022/017346**

| Patent document<br>cited in search report | Publication date<br>(day/month/year) | Patent family member(s) | Publication date<br>(day/month/year) |
|-------------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------|--------------------------------------|
| KR 10-2019-0133943 A                      | 04 December 2019                     | KR 10-2132425 B1        | 09 July 2020                         |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                        |                                               |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| <b>A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))</b><br><b>A01N 43/16(2006.01)i; A01N 63/20(2020.01)i</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                        |                                               |
| <b>B. 조사된 분야</b><br>조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)<br><b>A01N 43/16(2006.01); C02F 1/28(2006.01); C02F 1/40(2006.01)</b><br>조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌<br>한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC<br>일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC<br>국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))<br><b>eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) &amp; 키워드: 키토산(chitosan), 폴리에틸렌이민(polyethyleneimine), 복합체(composite), 코리넨박테리움 글루타미쿰(corynebacterium glutamicum), 남세균(cyanobacteria), 마이크로시스티스 에루지노사(Microcystis aeruginosa), 녹조(water bloom), 회수(recovery), 재생(regeneration)</b>                                          |                                                                                                                                                                                                                                                        |                                               |
| <b>C. 관련 문헌</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                        |                                               |
| 카테고리*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재                                                                                                                                                                                                                             | 관련 청구항                                        |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | WON, S. W. 등, "The role of biomass in polyethylenimine-coated chitosan/bacterial biomass composite biosorbent fiber for removal of Ru from acetic acid waste solution", Bioresource Technology, 2014.01.29(전자공개), 160권, 페이지 93-97<br>초록; 페이지 94, 왼쪽 칼럼 | 1-10                                          |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 김호선 등, "양이온성 고분자(polyethylenimine)가 코팅된 알지네이트/페바이오메스 복합 흡착소재를 사용한 유해 미생조류 Microcystis aeruginosa의 제거", Korean Journal of Environmental Biology (환경생물), 2019.12.31, 37권, 4호, 페이지 741-748<br>초록; 페이지 743-745                                             | 1-10                                          |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | YAASHIKAA, P. R. 등, "Journal of Hazardous Materials on pretreatment, removal mechanism and future outlook", Journal of Hazardous Materials, 2021.07.06(전자공개), 문헌번호 126596, 페이지 1-17<br>페이지 9, 오른쪽 칼럼 - 페이지 12, 왼쪽 칼럼                                   | 9-10                                          |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | KR 10-2019-0133943 A (고려대학교 산학협력단) 2019.12.04<br>전체 문헌                                                                                                                                                                                                 | 1-10                                          |
| <input checked="" type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                        |                                               |
| * 인용된 문헌의 특별 카테고리:<br>"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌<br>"D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌<br>"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌<br>"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌<br>"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌<br>"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌<br>"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌<br>"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.<br>"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.<br>"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌 |                                                                                                                                                                                                                                                        |                                               |
| 국제조사의 실제 완료일<br><b>2023년02월09일(09.02.2023)</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                        | 국제조사보고서 발송일<br><b>2023년02월10일(10.02.2023)</b> |
| ISA/KR의 명칭 및 우편주소<br>대한민국 특허청<br>(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)<br>팩스 번호 +82-42-481-8578                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                        | 심사관<br><br>허주형<br>전화번호 +82-42-481-5373        |

| C. 관련 문헌 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |        |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 카테고리*    | 인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 관련 청구항 |
| X        | <p>PARK, Y. H. 등, "Direct removal of harmful cyanobacterial species by adsorption process and their potential use as a lipid source", Chemical Engineering Journal, 2021.08.12(전자공개), 427권, 문헌번호 131727, 페이지 1-5</p> <p>전체 문헌</p> <p>※출원인이 신규성 상실의 예외로서 선언한 공지문헌임.</p>                                                                   | 1-10   |
| X        | <p>KIM, H. S. 등, "Amination of cotton fiber using polyethyleneimine and its application as an adsorbent to directly remove a harmful cyanobacterial species, Microcystis aeruginosa, from an aqueous medium", Environmental Research, 2021.04.29(전자공개), 197권, 문헌번호 111235, 페이지 1-8</p> <p>전체 문헌</p> <p>※출원인이 신규성 상실의 예외로서 선언한 공지문헌임.</p> | 1-8    |

