



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년08월21일
(11) 등록번호 10-1432277
(24) 등록일자 2014년08월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C11B 1/10 (2006.01) C10L 1/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0046317
(22) 출원일자 2013년04월25일
심사청구일자 2013년04월25일
(65) 공개번호 10-2013-0130627
(43) 공개일자 2013년12월02일
(30) 우선권주장
1020120054393 2012년05월22일 대한민국(KR)
(56) 선행기술조사문헌
JP2006507818 A
KR100741644 B1
KR1020110077723 A
KR1020030059086 A

(73) 특허권자
한국과학기술원
대전광역시 유성구 대학로 291(구성동)
(72) 발명자
임성갑
대전광역시 유성구 대학로 291 한국과학기술원 생
명화학공학과
양지원
대전광역시 유성구 대학로 291 한국과학기술원 생
명화학공학과
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
장제환, 이처영

전체 청구항 수 : 총 26 항

심사관 : 김정태

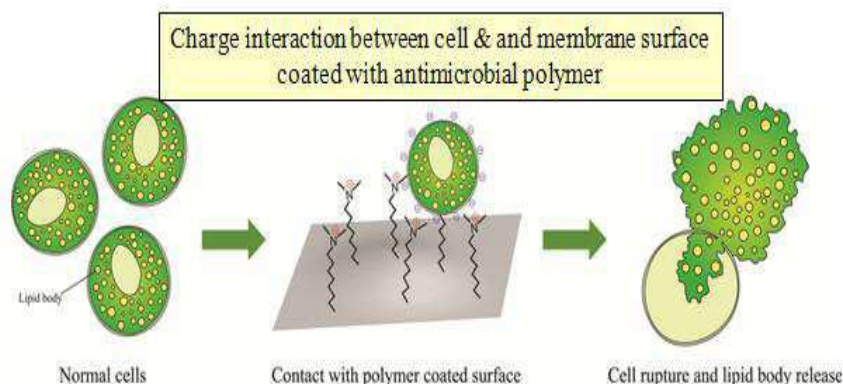
(54) 발명의 명칭 양이온성 고분자를 이용한 미세조류로부터 지질의 추출방법 및 추출된 지질을 이용한 바이오디젤 제조방법

(57) 요약

본 발명은 양이온성 고분자를 이용한 미세조류로부터 지질의 추출방법 및 추출된 지질을 이용한 바이오디젤 제조방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 미세조류의 건조 과정 없이, 음전하를 띠고 있는 미세조류의 세포벽을 파괴할 수 있도록, 말단에 양전하기와 지방족 사슬을 포함하는 고분자를 이용한 미세조류로부터 지질의 추출방법 및 추출된 지질을 이용한 바이오디젤 제조방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른 미세조류로부터 지질의 추출방법 및 추출된 지질을 이용한 바이오디젤 제조방법은 미세조류의 건조 과정 없이, 미세조류로부터 지질을 추출할 수 있으므로, 바이오디젤의 에너지 및 생산단가 절감에 효과가 있다. 또한 처리 과정에서 소모되는 화학물질이 없고, 별도로 투입되는 에너지 없이 고분자 코팅과 미세조류 세포벽 사이의 상호작용만으로 처리가 이루어지므로 친환경적인 바이오디젤 하부공정을 실현할 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

유영민

서울특별시 송파구 잠전로9길 15 202호 (잠실동)

유거송

대전광역시 유성구 대학로 291 한국과학기술원 생
명화학공학과 5113호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-0031346

부처명 교육과학기술부

연구사업명 글로벌 프론티어연구개발사업(차세대 바이오매스 연구)

연구과제명 기능성 나노 박막을 이용한 새로운 바이오매스 추출방법 개발

기 여 율 1/1

주관기관 (재)차세대 바이오매스연구단

연구기간 2011.08.22 ~ 2012.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

(a) 미세조류 배양액에 양이온성 고분자를 첨가하고 혼합한 다음, 용출액을 첨가하여 상을 분리시키는 단계; 및
(b) 상기 상분리된 혼합액의 상층부를 분리한 다음, 용출액을 제거하여 지질을 수득하는 단계;
를 포함하는 양이온성 고분자를 이용한 미세조류로부터 지질의 추출방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 (a)단계의 미세조류는 클라미도모나스 레인하르티(*Chlamydomonas reinhardtii*), 오란티오키트리움 에스피. KRS101(*Aurantiochytrium sp. KRS101*), 클로렐라 볼가리스(*Chlorellavugaris*) 및 세네데스무스 에스피. (*Scenedecmus sp.*)로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 양이온성 고분자를 이용한 미세조류로부터 지질의 추출방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 양이온성 고분자의 첨가량은 상기 미세조류 배양액 100중량부에 대하여, 0.001 내지 0.1 중량부인 것을 특징으로 하는 양이온성 고분자를 이용한 미세조류로부터 지질의 추출방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 양이온성 고분자는 그 말단에 양전하기와 지방족 사슬을 가지는 것임을 특징으로 하는 양이온성 고분자를 이용한 미세조류로부터 지질의 추출방법.

청구항 5

제1항 또는 제4항에 있어서, 상기 양이온성 고분자는 폴리-2-다이메틸아미노에틸 메타크릴레이트(pDMAEMA), 폴리-N-(4-비닐벤질)-N,N-다이메틸아민(pDMAMS), 폴리-1-비닐피롤리돈(p1-VP), 폴리 다이에틸아미노에틸아크릴레이트(pDEAEA), 폴리 다이메틸아미노에틸아크릴레이트(pDMAEA) 및 폴리 다이에틸아미노에틸메타크릴레이트(pDEAMA)로 이루어진 군에서 선택되는 것임을 특징으로 하는 양이온성 고분자를 이용한 미세조류로부터 지질의 추출방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 양이온 고분자는 고분자 입자, 고분자 용액 및 고분자 박막의 형태로 구성된 군에서 선택되는 것임을 특징으로 하는 양이온성 고분자를 이용한 미세조류로부터 지질의 추출방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 (a)단계의 혼합 시간은 30분 ~ 48시간인 것을 특징으로 하는 고분자 박막을 이용한 미세조류로부터 지질의 추출방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 (a)단계의 용출액은 노멀 헥산(n-hexane), 클로로포름(chloroform), 디메틸 에테르(dimethyl ether), 펜탄(pentane), 옥탄(octane), 헵탄(heptane), 데칸(decane), 도데칸(dodecane), 에틸 아세테이트(ethyl acetate), 아세토나이트릴(acetonitrile), 싸클로헥산(cyclohexane), 아세톤(acetone), 프로판올(propanol), 에탄올(ethanol) 및 메탄올(methanol)로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 고분자 박막을 이용한 미세조류로부터 지질의 추출방법.

청구항 9

(a) 미세조류 배양액 100 중량부에 대하여 폴리-N-(4-비닐벤질)-N,N-디메틸아민(pDMAMS) 0.001 내지 0.1 중량부를 첨가하고 2~24시간동안 혼합한 다음, 노멀 헥산(n-hexane)을 첨가하여 상을 분리시키는 단계; 및
(b) 상기 상분리된 혼합액의 상층부를 분리한 다음, 노멀 헥산(n-hexane)을 제거하여 지질을 수득하는 단계;
를 포함하는 폴리-N-(4-비닐벤질)-N,N-디메틸아민(pDMAMS)을 이용한 미세조류로부터 지질의 추출방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 (a)단계의 미세조류는 클라미도모나스 레인하르티(*Chlamydomonas reinhardtii*), 오란티오키트리움 에스피. KRS101(*Aurantiochytrium sp. KRS101*), 클로렐라 불가리스(*Chlorellavugaris*) 및 세네데스무스 에스피. (*Scenedecmus sp.*)로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 폴리-N-(4-비닐벤질)-N,N-디메틸아민(pDMAMS)을 이용한 미세조류로부터 지질의 추출방법.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 폴리-N-(4-비닐벤질)-N,N-디메틸아민(pDMAMS)은 pDMAMS 입자, pDMAMS 용액 및 pDMAMS 박막의 형태로 구성된 군에서 선택되는 것임을 특징으로 하는 폴리-N-(4-비닐벤질)-N,N-디메틸아민(pDMAMS)을 이용한 미세조류로부터 지질의 추출방법.

청구항 12

(a) 미세조류 배양액에 양이온성 고분자를 첨가하고 혼합한 다음, 용출액을 첨가하여 상을 분리시키는 단계;
(b) 상기 상분리된 혼합액의 상층부를 분리한 다음, 용출액을 제거하여 지질을 수득하는 단계; 및
(c) 상기 수득된 지질을 바이오디젤로 전환시키는 단계;
를 포함하는 바이오디젤의 제조방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 (a)단계의 미세조류는 클라미도모나스 레인하르티(*Chlamydomonas reinhardtii*), 오란티오키트리움 에스피. KRS101(*Aurantiochytrium sp. KRS101*), 클로렐라 불가리스(*Chlorellavugaris*) 및 세네데스무스 에스피. (*Scenedecmus sp.*)로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 바이오디젤의 제조방법.

청구항 14

제12항에 있어서, 상기 양이온성 고분자의 첨가량은 상기 미세조류 배양액 100 중량부에 대하여, 0.001 내지 0.1 중량부인 것을 특징으로 하는 바이오디젤의 제조방법.

청구항 15

제12항에 있어서, 상기 양이온성 고분자는 그 말단에 양전하기와 지방족 사슬을 가지는 것임을 특징으로 하는 바이오디젤의 제조방법.

청구항 16

제12항 또는 제15항에 있어서, 상기 양이온성 고분자는 폴리-2-다이메틸아미노에틸 메타크릴레이트(pDMAEMA), 폴리-N-(4-비닐벤질)-N,N-다이메틸아민(pDMAMS), 폴리-1-비닐피롤리돈(p1-VP), 폴리 다이에틸아미노에틸아크릴레이트(pDEAEA), 폴리 다이메틸아미노에틸아크릴레이트(pDMAEA) 및 폴리 다이에틸아미노에틸메타크릴레이트(pDEAMA)로 이루어진 군에서 선택되는 것임을 특징으로 하는 바이오디젤의 제조방법.

청구항 17

제12항에 있어서, 상기 양이온 고분자는 고분자 입자, 고분자 용액 및 고분자 박막의 형태로 구성된 군에서 선택되는 것임을 특징으로 하는 바이오디젤의 제조방법.

청구항 18

제12항에 있어서, 상기 (a)단계의 혼합 시간은 30분 ~ 48시간인 것을 특징으로 하는 바이오디젤의 제조방법.

청구항 19

제12항에 있어서, 상기 (a)단계의 용출액은 노멀 헥산(n-hexane), 클로로포름(chloroform), 디메틸 에테르(dimethyl ether), 펜탄(pentane), 옥탄(octane), 헵탄(heptane), 데칸(decane), 도데칸(dodecane), 에틸 아세테이트(ethyl acetate), 아세토나이트릴(acetonitrile), 사이클로헥산(cyclohexane), 아세톤(acetone), 프로판올(propanol), 에탄올(ethanol) 및 메탄올(methanol)로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 바이오디젤의 제조방법.

청구항 20

제12항에 있어서, 상기 (c)단계는 효소, 산촉매 및 염기촉매로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나를 이용하는 것을 특징으로 하는 바이오디젤의 제조방법.

청구항 21

제12항에 있어서, 상기 (a)단계에서 상분리된 혼합액의 하층부에서 잔류 미세조류를 수득하여 건조한 다음, 클로로포름과 메탄올에 용해시키고 황산과 메탄올을 첨가하여 바이오디젤로 전환시키는 단계를 추가로 포함하는 바이오디젤의 제조방법.

청구항 22

- (a) 미세조류 배양액 100 중량부에 대하여 폴리-N-(4-비닐벤질)-N,N-다이메틸아민(pDMAMS) 0.001 내지 0.1 중량부를 첨가하고 2~24시간동안 혼합한 다음, 용출액을 첨가하여 상을 분리시키는 단계;
- (b) 상기 상분리된 혼합액의 상층부를 분리한 다음, 용출액을 제거하여 지질을 수득하는 단계; 및
- (c) 상기 수득된 지질을 바이오디젤로 전환시키는 단계;

를 포함하는 바이오디젤의 제조방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 (a)단계의 미세조류는 클라미도모나스 레인하르티(*Chlamydomonas reinhardtii*), 오란티 오키트리움 에스피. KRS101(*Aurantiochytrium sp. KRS101*), 클로렐라 불가리스(*Chlorellavugaris*) 및 세네데스 무스 에스피.(*Scenedecmus sp.*)로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 바이오디젤의 제조방법.

청구항 24

제22항에 있어서, 상기 폴리-N-(4-비닐벤질)-N,N-디메틸아민(pDMAMS)은 pDMAMS 입자, pDMAMS 용액 및 pDMAMS 박막의 형태로 구성된 군에서 선택되는 것임을 특징으로 하는 바이오디젤의 제조방법.

청구항 25

제22항에 있어서, 상기 (c)단계는 효소, 산촉매 및 염기촉매로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나를 이용하는 것임을 특징으로 하는 바이오디젤의 제조방법.

청구항 26

제22항에 있어서, 상기 (a)단계에서 상분리된 혼합액의 하층부에서 잔류 미세조류를 수득하여 건조한 다음, 클로로포름과 메탄올에 용해시키고 황산과 메탄올을 첨가하여 바이오디젤로 전환시키는 단계를 추가로 포함하는 바이오디젤의 제조방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 양이온성 고분자를 이용한 미세조류로부터 지질의 추출방법 및 추출된 지질을 이용한 바이오디젤 제조방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 미세조류의 건조 과정 없이, 음전하를 띠고 있는 미세조류의 세포벽을 파괴할 수 있도록, 말단에 양전하기와 지방족 사슬을 포함하는 고분자를 이용한 미세조류로부터 지질의 추출방법 및 추출된 지질을 이용한 바이오디젤 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 제사용에너지 중 미세조류(microalgae)를 이용한 바이오디젤(biodiesel)은 미세조류의 높은 성장률과 지질 함량, 그리고 넓은 육지 면적을 필요로 하지 않아 식량작물 또는 삼림자원과 경쟁하지 않는다는 장점에 의해 매우 주목받고 있는 바이오매스이다. 미세조류 중 녹조류에 해당하는 *Chlorella*, *Chlamydomonas*, *Botryococcus*, *Scenedesmus*와 같은 종은 동물과 유사하게 과잉에너지를 지질(lipid)로 세포 내에 축적하는 성질이 있다. 미세조류를 이용하여 바이오디젤을 생산하는 공정은, 배양 조건을 최적화하여 세포 밀도와 지질 함량이 최대가 되도록 배양한 다음, 응집 등의 방법으로 세포 내의 지질을 추출하고, 촉매를 사용하여 트랜스에스테르화 반응(transesterification)을 시켜 석유에서 정제한 경유(petrodiesel)와 유사한 성질을 가지는 바이오디젤을 획득하는 과정으로 이루어진다.

[0003] 일반적으로 미세조류는 식물로 분류되고, 식물 세포의 특징을 가지고 있는데, 일반 세균(bacteria)이나 동물세포와 다르게 세포벽(cell wall) 구조를 가지고 있어 세포막(cell membrane)과 다르게 매우 복잡한 구조로 되어 있다. 세포막의 경우, 이중지질막 구조(lipid bilayer)로 되어있는데, 한쪽 끝은 친수기, 반대쪽은 소수성 지방족 사슬(aliphatic chain)로 구성된 인지질(phospholipid) 분자들이 소수성 사슬끼리 안쪽으로 맞물려있고 친수기가 바깥으로 노출되도록 이중으로 막을 구성하고 있는 구조이다. 반면에 세포벽은 공통적으로 알려진 성분이

나 구조가 특별히 존재하지 않으며, 종에 따라서 두께가 다르며 구체적인 분자구조도 정확히 밝혀져 있는 경우는 거의 없다. 하지만 일반적인 두께는 100nm 전후로 세포막보다 매우 두꺼우며, 대개 셀룰로스(cellulose), 마노스(mannose) 등의 다당류(polysaccharide)와 단백질로 구성되어 있고, 매우 단단해 식물체의 몸체를 지탱할 수 있게 해준다.

[0004] 현재 알려져 있는 미세조류의 세포벽 분쇄 방법은 초음파를 이용한 캐비테이션(cavitation), 비드 비팅(bead-beating), 마이크로파(microwave) 등이 있다. 초음파 캐비테이션은 초음파에 의해 발생하는 마이크로 크기의 기포의 높은 온도와 압력을 이용하는 방법이고, 비드 비팅(bead-beating)은 모래와 같은 입자와 미세조류를 섞어 강하게 흔들어 세포를 분쇄시키는 것이다. 마이크로파(microwave)는 세포 내외의 물 분자를 회전시켜 그 에너지를 이용하는 방법이다. 하지만 이 방법들은 높은 분쇄 효율을 위해서 많은 에너지를 필요로 하거나, 세포에 많은 열을 가하게 되므로 지질의 성분이 변성되는 등의 문제점을 가지고 있다.

[0005] 이에, 캐나다특허 제2,115,571호에서는 에탄올을 이용하여 속슬렛 추출법(S Soxhlet apparatus)으로 갈조류 및 홍조류로부터 지질을 추출하였고, 대한민국 공개특허 제2011-0116945호에서는 유기용매를 사용하여 미세조류로부터 지질을 분획하여 바이오디젤을 생산하였으나, 이는 유기용매를 이용한 직접적 추출법으로, 미세조류가 건조되어 있지 않으면 물 상의 미세조류와 유기용매가 충분한 접촉을 할 수 없기 때문에 효율이 급격히 떨어지며, 유독성의 유기용매를 다량으로 사용하기 때문에 에너지 및 환경적인 문제점이 있다.

[0006] 또한, Mercer and Armenta, 2011(Developments in oil extraction from microalgae, Paula Mercer and Roberto E. Armenta, European Journal of Lipid Science and Technology, Vol 113, Issue 5, Pages 539-547)의 연구에서는 초임계 CO₂를 이용하는 추출법을 개시하였다. 이는 유기용매를 사용하지 않아 친환경적이나, 역시 미세조류가 건조되어 있지 않으면 지질 회수율이 매우 떨어지고, CO₂를 초임계 상태로 유지시키는데 에너지가 많이 드는 문제점이 있다.

[0007] 이에, 본 발명자들은 상기 문제점을 해결하기 위하여 예의 노력한 결과, 말단에 양전하기와 지방족 사슬을 포함하는 고분자를 이용하여, 미세조류의 건조 과정 없이, 미세조류로부터 지질을 추출할 수 있다는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 지질 회수율의 향상과 에너지 절감을 위하여 막대한 에너지가 소비되는 미세조류의 건조과정 없이, 미세조류로부터 지질을 추출하고, 추출된 지질을 이용하여 바이오디젤을 제조하는 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (a) 미세조류 배양액에 양이온성 고분자를 첨가하고 혼합한 다음, 용출액을 첨가하여 상을 분리시키는 단계; 및 (b) 상기 상분리된 혼합액의 상층부를 분리한 다음, 용출액을 제거하여 지질을 수득하는 단계를 포함하는 양이온성 고분자를 이용한 미세조류로부터 지질의 추출방법을 제공한다.

[0010] 본 발명은 또한, (a) 미세조류 배양액 100 중량부에 대하여 폴리-N-(4-비닐벤질)-N,N-디메틸아민(pDMAMS) 0.001 내지 0.1 중량부를 첨가하고 2~24시간동안 혼합한 다음, 용출액을 첨가하여 상을 분리시키는 단계; 및 (b) 상기 상분리된 혼합액의 상층부를 분리한 다음, 용출액을 제거하여 지질을 수득하는 단계를 포함하는 폴리-N-(4-비닐벤질)-N,N-디메틸아민(pDMAMS)을 이용한 미세조류로부터 지질의 추출방법을 제공한다.

[0011] 본 발명은 또한, (a) 미세조류 배양액에 양이온성 고분자를 첨가하고 혼합한 다음, 용출액을 첨가하여 상을 분리시키는 단계; (b) 상기 상분리된 혼합액의 상층부를 분리한 다음, 용출액을 제거하여 지질을 수득하는 단계; 및 (c) 상기 수득된 지질을 바이오디젤로 전환시키는 단계를 포함하는 양이온성 고분자를 이용하여 추출된 미세조류 지질을 이용한 바이오디젤의 제조방법을 제공한다.

[0012] 본 발명은 또한, (a) 미세조류 배양액 100 중량부에 대하여 폴리-N-(4-비닐벤질)-N,N-디메틸아민(pDMAMS) 0.001

내지 0.1 중량부를 첨가하고 2~24시간동안 혼합한 다음, 용출액을 첨가하여 상을 분리시키는 단계; (b) 상기 상 분리된 혼합액의 상층부를 분리한 다음, 용출액을 제거하여 지질을 수득하는 단계; 및 (c) 상기 수득된 지질을 바이오디젤로 전환시키는 단계를 포함하는 폴리-N-(4-비닐벤질)-N,N-디메틸아민(pDMAMS)을 이용하여 추출된 미세조류 지질을 이용한 바이오디젤의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명에 따른 미세조류로부터 지질의 추출방법 및 추출된 지질을 이용한 바이오디젤 제조방법은 미세조류의 건조 과정 없이, 미세조류로부터 지질을 추출할 수 있으므로, 바이오디젤의 에너지 및 생산단가 절감에 효과가 있다. 또한 처리 과정에서 소모되는 화학물질이 없고, 별도로 투입되는 에너지 없이 고분자 코팅과 미세조류 세포벽 사이의 상호작용만으로 처리가 이루어지므로 친환경적인 바이오디젤 하부공정을 실현할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 본 발명에 따른 양이온성 고분자를 이용한 미세조류의 세포벽 파괴 과정을 개략적으로 도시한 도면이다.

도 2는 본 발명에 따른 폴리-2-디메틸라미노에틸 메타크릴레이트-에틸렌 글리콜 디아크릴레이트(pDMAEMA-EGDA) 나노 박막과 대조군(나일론 메쉬)을 이용한 클라미도모나스의 세포벽 파괴 실험에 대한 엽록소(Chlorophyll) 측정 결과이다.

도 3은 본 발명에 따른 폴리-2-디메틸라미노에틸 메타크릴레이트-에틸렌 글리콜 디아크릴레이트(pDMAEMA-EGDA) 나노 박막과 대조군(나일론 메쉬)을 이용한 클라미도모나스의 세포벽 파괴 실험에 대한 나일 레드(Nile red) 염색 측정 결과이다.

도 4는 본 발명에 따른 폴리-N-(4-비닐벤질)-N,N-디메틸아민(pDMAMS) 나노 박막과 대조군(나일론 메쉬)을 이용한 오란티오키트리움의 세포벽 파괴 실험에 대한 보디피(BODIPY) 염색 측정 결과이다.

도 5는 본 발명에 따른 폴리-2-디메틸라미노에틸 메타크릴레이트-에틸렌 글리콜 디아크릴레이트(pDMAEMA-EGDA), 폴리-N-(4-비닐벤질)-N,N-디메틸아민(pDMAMS) 및 폴리-1-비닐피롤리돈(p1-VP) 나노 박막과 대조군(나일론 메쉬)을 이용한 오란티오키트리움의 세포벽 파괴 실험에 대한 지질 추출량을 나타낸 그래프이다.

도 6은 고분자 박막을 이용한 오란티오키트리움의 지질 추출을 위한 전처리 공정 실험에 관한 프로토콜을 도시한 도면이다.

도 7은 본 발명에 따른 폴리-N-(4-비닐벤질)-N,N-디메틸아민(pDMAMS) 박막(위쪽)과 대조군(나일론 메쉬, 아래쪽)을 이용한 오란티오키트리움의 세포벽 파괴 실험에 대한 현미경 사진이다.

도 8은 본 발명에 따른 폴리-N-(4-비닐벤질)-N,N-디메틸아민(pDMAMS) 박막과 대조군(나일론 메쉬)의 오란티오키트리움의 세포벽 파괴 실험에 대한 지질 추출량을 나타낸 그래프이다.

도 9(a)는 DMAMS 단량체와 iCVD를 통하여 증착된 pDMAMS 고분자의 FT-IR(Fourier transform infrared spectroscopy) 스펙트럼을 도시한 것이고, 도 9(b)는 오란티오키트리움과 pDMAMS 고분자가 코팅된 나일론 메쉬의 제타 퍼텐셜(zeta potential)을 도시한 그래프이다.

도 10은 나일론 메쉬(왼쪽)와 pDMAMS가 코팅된 멤브레인(오른쪽)의 SEM 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 본 발명에서는 말단에 양전하기와 지방족 사슬을 포함하는 고분자 나노 박막을 이용할 경우, 미세조류의 건조 과정 없이, 미세조류로부터 지질을 추출하고, 바이오디젤을 생산할 수 있음을 확인하고자 하였다.

[0016] 본 발명에서는, 미세조류의 건조 과정 없이, 음전하를 띠고 있는 미세조류의 세포벽을 파괴할 수 있도록, 말단에 양전하기와 지방족 사슬을 포함하는 고분자 나노 박막을 이용하여 미세조류로부터 지질 추출하고 바이오디젤을 생산하였다. 그 결과, 에너지를 절감하고, 지질 회수율을 증가시킬 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.

- [0017] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, (a) 미세조류 배양액에 양이온성 고분자를 첨가하고 혼합한 다음, 용출액을 첨가하여 상을 분리시키는 단계; 및 (b) 상기 상분리된 혼합액의 상층부를 분리한 다음, 용출액을 제거하여 지질을 수득하는 단계를 포함하는 양이온성 고분자를 이용한 미세조류로부터 지질의 추출방법에 관한 것이다.
- [0018] 본 발명에 있어서, 미세조류는 바이오매스로 이용할 수 있는 한 특별한 제한 없이 이용될 수 있으나, 클라미도모나스 레인하르티(*Chlamydomonas reinhardtii*), 오란티오키티리움 에스피. KRS101(*Aurantiochytrium* sp. KRS101), 클로렐라 불가리스(*Chlorella vulgaris*) 및 세네데스무스 에스피. (*Scenedesmus* sp.) 으로 이루어진 군에서 선택되고, 바람직하게는 오란티오키티리움 에스피. KRS101(*Aurantiochytrium* sp. KRS101)을 사용할 수 있다. 오란티오키티리움 에스피. KRS101(*Aurantiochytrium* sp. KRS101)의 경우, 세포벽이 연약하고 지질함량이 50% 정도로 풍부한 장점이 있어 바이오매스로부터의 지질추출이 용이하다.
- [0019] 상기 양이온성 고분자는 미세조류의 세포벽을 파괴시키기 위한 것으로 음전하를 띠고 있는 미세조류의 세포벽의 전하를 교란시킬 수 있는 말단에 양전하기와 지방족 사슬을 포함하는 고분자를 사용하는 것이 바람직하다. 상기 양이온성 고분자는 폴리-2-다이메틸아미노에틸 메타크릴레이트(pDMAEMA), 폴리-N-(4-비닐벤질)-N,N-다이메틸아민(pDMAMS), 폴리-1-비닐피롤리돈(p1-VP), 폴리 다이에틸아미노에틸아크릴레이트(pDEAEA), 폴리 다이메틸아미노에틸아크릴레이트(pDMAEA) 및 폴리 다이에틸아미노에틸메타크릴레이트(pDEAMA)로 예시할 수 있다. 상기 고분자는 말단에 양전하를 띠고 있는 질소를 포함하는 3차 아민(tertiary amine)이 음전하를 띠고 있는 미세조류와 접촉하여 세포벽에서 전하 분열(charge disruption)을 발생시켜 세포벽이 파괴됨으로써, 지질 추출에 훨씬 용이한 상태를 만든다. 이때, 양이온성 고분자는 특별한 제한 없이 이용될 수 있으나, 고분자 입자, 고분자 용액 및 고분자 박막의 형태 등으로 예시할 수 있다.
- [0020] 상기 양이온성 고분자는 상기 미세조류 배양액에 대하여, 0.001 내지 0.1 중량부를 사용할 수 있다. 바람직하게는 0.002 내지 0.08중량부, 더욱 바람직하게는 0.002 내지 0.02중량부를 사용할 수 있다. 0.001 중량부 미만일 경우, 미세조류와의 접촉물이 낮아지는 문제점이 있고, 0.1 중량부를 초과할 경우, 미세조류가 양이온성 고분자에 엉겨 붙어 혼합(shake)이 잘 되지 않는 문제점이 있다.
- [0021] 상기 미세조류 배양액과 고분자 박막의 혼합은 30분 ~ 48시간 수행되며, 24시간 수행되는 것이 바람직하다. 30분 미만일 경우, 세포벽의 아무런 영향을 주지 못하며, 24시간을 초과할 경우, 세포벽이 파괴되어 지질이 세포벽 바깥으로 방출되어 서로 엉겨 붙는 문제점이 있어 더 이상 추출 효율이 증가되지 않는다.
- [0022] 상기 (b)단계에서 용출액은 상기 혼합액의 상분리를 위한 것으로서, 노멀 헥산(n-hexane), 클로로포름(chloroform), 디메틸 에테르(dimethyl ether), 펜탄(pentane), 옥탄(octane), 헵탄(heptane), 데칸(decane), 도데칸(dodecane), 에틸 아세테이트(ethyl acetate), 아세토나이트릴(acetonitrile), 사이클로헥산(cyclohexane), 아세톤(acetone), 프로판올(propanol), 에탄올(ethanol) 및 메탄올(methanol)로 이루어진 군에서 선택되고, 바람직하게는 노멀 헥산(n-hexane)을 사용할 수 있다.
- [0023] 본 발명은 다른 관점에서, (a) 미세조류 배양액 100 중량부에 대하여 폴리-N-(4-비닐벤질)-N,N-다이메틸아민(pDMAMS) 0.001 내지 0.1 중량부를 첨가하고 2~24시간동안 혼합한 다음, 용출액을 첨가하여 상을 분리시키는 단계; 및 (b) 상기 상분리된 혼합액의 상층부를 분리한 다음, 용출액을 제거하여 지질을 수득하는 단계를 포함하는 폴리-N-(4-비닐벤질)-N,N-다이메틸아민(pDMAMS)을 이용한 미세조류로부터 지질의 추출방법에 관한 것이다.
- [0024] 한편, 본 발명에서는, 음전하를 띠고 있는 미세조류의 세포벽을 파괴할 수 있도록, 말단에 양전하기와 지방족 사슬을 포함하는 폴리-N-(4-비닐벤질)-N,N-다이메틸아민(pDMAMS)을 이용하여 미세조류로부터 지질 추출할 경우, 에너지를 절감하고, 지질 회수율을 증가시킬 수 있다는 것을 확인하였다.
- [0025] 따라서, 본 발명은 또 다른 관점에서, (a) 미세조류 배양액에 양이온성 고분자를 첨가하고 혼합한 다음, 용출액을 첨가하여 상을 분리시키는 단계; (b) 상기 상분리된 혼합액의 상층부를 분리한 다음, 용출액을 제거하여 지질을 수득하는 단계; 및 (c) 상기 수득된 지질을 클로로포름에 용해시킨 다음, 황산과 메탄올을 첨가하여 바이오디젤로 전환시키는 단계를 포함하는 양이온성 고분자를 이용하여 추출된 미세조류 지질을 이용한 바이오디젤의 제조방법에 관한 것이다.
- [0026] 상기 미세조류로부터 지질을 추출하는 방법은 앞서 설명한 바와 동일하다.
- [0027] 상기 (c)단계에서 수득된 지질의 바이오디젤 제조방법은 이용할 수 있는 한 특별한 제한 없이 이용될 수

있으나, 효소, 산촉매 및 염기촉매로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 사용하는데, 바람직하게는 산촉매를 사용할 수 있다. 이때, 산촉매는 액상촉매(homogeneous catalyst) 및 고상촉매(heterogeneous catalyst)로 이루어진 군에서 선택되고, 바람직하게는 액상촉매를 사용할 수 있다. 고상촉매의 경우, 촉매의 회수 및 재사용이 용이하다는 장점이 있으나 현재 반응속도 면에서 개선이 요구되는 문제점이 있다. 산촉매에 의한 바이오디젤의 제조방법은 수득된 지질을 클로로포름에 용해시킨 다음, 황산과 메탄올을 첨가하여 바이오디젤로 전환시킨다. 이때, 황산과 메탄올은 부피비 1:1 ~ 1:2000로 혼합된 혼합액을 사용하고, 바람직하게는 1:200 ~ 1:500인 혼합액을 사용할 수 있다.

[0028] 본 발명에서는, 상기 (a)단계에서 상분리된 혼합액의 하층부에서 잔류 미세조류를 수득하여 건조한 다음, 클로로포름과 메탄올에 용해시키고 황산과 메탄올을 첨가하여 바이오디젤을 생산하는 단계를 추가로 수행할 경우, 지질 회수율이 100% 증가하는 장점이 있다.

[0029] 본 발명은 또 다른 관점에서, (a) 미세조류 배양액 100 중량부에 대하여 폴리-N-(4-비닐벤질)-N,N-디메틸아민(pDMAMS) 0.001 내지 0.1 중량부를 첨가하고 2~24시간동안 혼합한 다음, 용출액을 첨가하여 상을 분리시키는 단계; (b) 상기 상분리된 혼합액의 상층부를 분리한 다음, 용출액을 제거하여 지질을 수득하는 단계; 및 (c) 상기 수득된 지질을 바이오디젤로 전환시키는 단계를 포함하는 폴리-N-(4-비닐벤질)-N,N-디메틸아민(pDMAMS)을 이용하여 추출된 미세조류 지질을 이용한 바이오디젤의 제조방법에 관한 것이다.

[0030] 도 1에 도시한 바와 같이, 3차 아민기를 가지는 양이온성 고분자(antimicrobial polymer)는 (+) 전하를 띠고 있는 미생물의 표면과 정전기적 인력(electrostatic force)에 의한 작용을 거쳐 세포벽과 세포막을 파괴하는 작용이 있다. 본 실시예에서는 이것을 미세조류의 지질 추출 과정을 위한 전처리 공정으로 개발하기 위해 나일론 천에 PDMAMS(polydimethylaminomethyl styrene)을 iCVD 공정을 통해 코팅하여 *Aurantiochytrium* sp. KRS101 균주의 배양액에 접촉시켰다. iCVD 공정은 이러한 성질의 고분자를 거의 아무 표면이나 코팅할 수 있는 유용한 공정이며, 코팅을 한 후에는 물에 고분자가 녹아나오지 않기 때문에 코팅한 천(membrane)을 쉽게 회수하여 재사용할 수 있는 가능성이 있다. 또한 실제 공정에 적용한다고 가정할 시에도 반응기 벽면이나 일정한 고정물에 코팅하지 않고 용해시켜 사용할 경우에는 경제성이 없을 뿐만 아니라 용해된 상태에서는 수영장의 녹조 제거 등의 용도에 널리 사용되고 있다.

[0031] 본 발명에 의한 고분자 박막의 구조 및 표면 성질을 확인하고자 한다.

[0032] DMAMS 단량체와 iCVD를 통하여 증착된 pDMAMS 고분자의 FT-IR(Fourier transform infrared spectroscopy) 스펙트럼을 도 9에 나타내었다. 위쪽은 DMAMS 단량체이며, *durldtpj* 불포화 탄소 C=C의 피크가 1630cm^{-1} 로 관찰되었고, 비닐기(=CH 및 =CH₂)의 C-H 결합의 신축 및 굽힘 진동 피크가 3095 및 900cm^{-1} 로 각각 감지되었다. 아미드기의 3차 아민기는 또한 2770cm^{-1} 에서 발견되었다. 860cm^{-1} 에서의 피크는 이치환된 벤젠에서의 C-H 결합에 해당된다. iCVD pDMAMS의 스펙트럼에서 단량체의 C=C 이중결합에 해당되는 피크가 상당히 감소하였다(도 9(a)). iCVD 고분자의 스펙트럼에서 비닐기의 소실은 DMAMS 단량체가 iCVD 공정을 통하여 성공적으로 중합되었다는 것을 의미한다. 한편, pDMAMS 고분자에서 3차 아민기를 유지하고 있는 것 또한 iCVD 고분자의 FT-IR 스펙트럼에 의하여 확인되었다. 이치환된 벤젠 링에서 C-H 신축 피크는 860cm^{-1} 에서 감지되었다. 아미드기의 3차 아민(C-N)기 피크는 2770cm^{-1} 에서 감지되었는데, 이는 DMAMS 단량체의 것과 매우 근접해 있다. iCVD pDMAMS에서 3차 아민기를 유지하는 것은 iCVD 공정이 중합 공정 동안에 DMAMS 단량체를 손상시키지 않는다는 것을 명확하게 보여주는 것이다. 세포 파괴 활성의 메커니즘은 양전하를 띠는 멤브레인과 음전하를 띠는 미세조류의 세포벽 사이의 정전기적 전하에 의한 인력에 관련되기 때문에, 배양배지와 멤브레인 표면 사이의 전기적 퍼텐셜 차이인 제타 퍼텐셜(zeta potential)을 측정하여 도 9(b)에 도시된 바와 같이, 양전하를 유지하고 있는 iCVD pDMAMS 코팅에 나일론 멤브레인이 변형된 것을 확인할 수 있다. iCVD pDMAMS의 측정된 제타 퍼텐셜은 $7.69 \pm 2.37\text{mV}$ 이었는데, 이로써 배양 배지에서 pDMAMS 코팅의 양전하 퍼텐셜이 유지되는 것을 확인할 수 있다. 이와 반대로, *Aurantiochytrium*의 제타 퍼텐셜은 예상한 바와 같이 $-14.22 \pm 0.05\text{mV}$ 이 측정되었다. 제타 퍼텐셜 분석은 iCVD 중합체 필름이 나일론 표면상에 성공적으로 투입되었다는 것을 증명해 준다. pDMAMS의 3차 아민기로부터

은 양전하 표면 퍼텐셜은 미세조류의 음전하를 띤 세포벽을 방해하여 결국 미세조류의 세포벽을 파괴시킬 수 있다.

[0033] 프리스틴(pristine) 멤브레인과 iCVD pDMAMS가 코팅된 멤브레인의 주사전자현미경(scanning electron microscope, SEM) 사진을 도 10에 도시하였는데, 상기 둘은 실질적으로 동일한 것으로 보인다. $1\mu\text{m}$ 두께의 pDMAMS 필름임에도 불구하고, 멤브레인의 모폴로지(morphology)는 프리스틴 멤브레인과 거의 변화가 없다. 이는 멤브레인의 메쉬 크기가 코팅된 고분자 필름보다 매우 크기 때문이며, 이는 iCVD 공정에 의하여 일체형으로(conformally) 코팅되었다는 것을 의미한다. 덧붙여진 각각의 접촉각 이미지를 보면, 상기 나일론 메쉬 상에 pDMAMS이 확실하게 코팅된 것을 알 수 있다. 미처리된 나일론 메쉬 및 pDMAMS가 코팅된 나일론 메쉬의 물 접촉각은 각각 111° 및 92° 이었다. 이 결과는 프리스틴 나일론 메쉬보다 친수성 성질을 가진 pDMAMS가 성공적으로 나일론 메쉬에 코팅된 것을 나타낸다.

[0034] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0035] 실시예 1: 미세조류 배양

[0036] 한천 TAP(Agar TAP, (Agar TAP ; 염화암모늄(Ammonium chloride), 황산마그네슘 7수화물(magnesium sulfate heptahydrate), 염화칼슘(calcium chloride) (Junsei Chemical, Tokyo, Japan), 트리스 얼트라퓨어(Tris ultrapure, Duchefa Biochemie, Haarlem, Netherlands), 제일인산칼륨과 제이인산칼륨(potassium phosphate monobasic and dibasic), 황산아연 7수화물(zinc sulfate heptahydrate), 염화코발트 6수화물(cobalt chloride hexahydrate), 황산구리 5수화물(copper sulfate pentahydrate), 몰리브덴산나트륨 탈수물(sodium molybdate dehydrate, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 붕산(boric acid), 염화망간 수화물(manganese chloride tetrahydrate), 황산철 7수화물(iron sulfate heptahydrate)(Samchun Chemicals, Seoul, Korea), EDTA 나트륨(sodium EDTA, MP Biochemicals, Solon, USA) 및 박토아가(Bactoagar, BD, Franklin Lakes, USA))배지에 보존된 클라미도모나스 레인하르티 천연종(*Chlamydomonas reinhardtii* wildtype strain ; CC-124(CC-124는 유전자 조작을 가하지 않은 천연종으로, 천연종으로는 CC-124와 CC-125가 있으나 CC-124를 사용. Chlamydomonas center)와 세포벽이 없는 돌연변이(mutant strain ; CC-400(CC-400은 CC-124에 유전자 조작을 가하여 세포벽을 제거한 종. 한국생명공학연구원) 균주를 100 ml의 액체 TAP 배지에 접종하고 3일간 배양하여 액체 배지에 균주를 적응시켰다. 그 다음, 새로운 액체 TAP 배지에 초기 광학 밀도 (750 nm)를 0.05 가 되도록 배양액을 접종하여 $182\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 의 형광등 빛과 25°C 온도, 123 rpm의 혼합(shaking) 조건에서 7일간 배양하였다.

[0037] 오란티오키트리움 에스피. KRS101(*Aurantiochytrium* sp. KRS101, 한국생명공학연구원)은 복합 배지(complex medium, glucose 60 g/L, yeast extract 10 g/L, KH_2PO_4 9 g/L, sea salt 15 g/L, tetracyclin 10 mg/L) 100 ml에서 4일간 적응시키고, 새로운 액체 복합 배지 200 ml 당 5 ml 씩 접종하여 25°C 온도, 120 rpm의 혼합(shaking) 조건에서 4일간 배양하였다.

[0038] 실시예 2: 고분자 박막의 제조

[0039] 2-1 : 폴리-2-다이메틸아미노에틸 메타크릴레이트-에틸렌 글리콜 디아크릴레이트(pDMAEMA-EGDA) 박막의 제조

[0040] 화학 기상 증착 반응기(iCVD reactor, Daeki Hi-Tech Co., Ltd)의 단량체통에 2-다이메틸아미노에틸 메타크릴레이트(DMAEMA, TCI, 98.5%)를 넣고 $25\sim 45^\circ\text{C}$, 또 다른 단량체통에 에틸렌 글리콜 디아크릴레이트(EGDA, Aldrich, 90%)를 넣고 $35\sim 50^\circ\text{C}$ 로 가열하였다. 개시제 테트라-부틸 퍼옥사이드(TBPO, Aldrich, 98%)는 개시체통에 넣고 상온으로 유지하고, 단량체와 개시제를 1:1~3:1 비율로 화학 증착 반응기 내에 흐르게 하였다. 반응기 내의 필라멘트(filament)의 온도는 200°C 로 유지하고, 반응기 내의 기판 온도는 $15\sim 35^\circ\text{C}$ 로 유지한 다음, 챔버 안에 $7\text{cm} \times 7\text{cm}$ 로 자른 나일론 메쉬(nylon mesh)를 올리고 평평하게 고정시켰다. 챔버 내의 압력은 200~400mTorr로 유지하고 filament 온도를 200°C 로 유지한 다음, 50분 경과 후, 200nm두께의 폴리-2-다이메틸아미노에틸 메타크릴레이트-에틸렌 글리콜 디아크릴레이트(pDMAEMA-EGDA)가 증착된 나일론 메쉬를 제조하였다. 상기과 같은 방법으로 나일론 메쉬의 뒷면에도 증착하여 양면에 폴리-2-다이메틸아미노에틸 메타크릴레이트-에

틸렌 글리콜 디아크릴레이트(pDMAEMA-EGDA)가 증착된 폴리-2-다이메틸아미노에틸 메타크릴레이트-에틸렌 글리콜 디아크릴레이트(pDMAEMA-EGDA) 박막을 제조하였다.

[0041] 2-2 : 폴리-N-(4-비닐벤질)-N,N-디메틸아민(pDMAMS) 박막의 제조

[0042] 상기와 같은 방법으로 N-(4-비닐벤질)-N,N-디메틸아민(DMAMS, Acros, 90%)는 단량체 온도 35~50℃, 챔버 압력 200~400mTorr, 필라멘트 온도 200℃, 반응기 내의 기판온도는 20~40℃로 50분 경과 후, 200nm 두께의 폴리-N-(4-비닐벤질)-N,N-디메틸아민(pDMAMS)이 증착된 나일론 메쉬를 제조하였다. 상기와 같은 방법으로 나일론 메쉬의 뒷면에도 증착하여 양면에 폴리-N-(4-비닐벤질)-N,N-디메틸아민(pDMAMS)이 증착된 폴리-N-(4-비닐벤질)-N,N-디메틸아민(pDMAMS) 박막을 제조하였다.

[0043] 2-3 : 폴리-1-비닐피롤리돈(p1-VP) 박막의 제조

[0044] 상기와 같은 방법으로 1-비닐피롤리돈(1-VP, TCI, 99%)은 단량체 온도 35~45℃, 챔버 압력 200~400mTorr, 필라멘트 온도 200℃, 반응기 내의 기판온도 15~35℃로 30분 경과 후, 200nm 두께의 폴리-1-비닐피롤리돈(p1-VP)이 증착된 나일론 메쉬를 제조하였다. 상기와 같은 방법으로 나일론 메쉬의 뒷면에도 증착하여 폴리-1-비닐피롤리돈(p1-VP) 박막을 제조하였다.

[0045] 실시예 3 : 미세조류로부터 지질 추출실험

[0046] 3-1 : 폴리-2-다이메틸아미노에틸 메타크릴레이트-에틸렌 글리콜 디아크릴레이트(pDMAEMA-EGDA) 나노 박막을 이용한 클라미도모나스 레인하르티(*Chlamydomonas reinhardtii*) 지질 추출

[0047] 75 cm² 배양 플라스크(Culture flask)에 클라미도모나스 레인하르티 배양액 20 ml 와 실시예 2-1에서 제조된 pDMAEMA-EGDA가 코팅된 나일론 메쉬를 7 cm × 7 cm 크기로 잘라서 함께 넣고 뚜껑을 잘 닫은 후, 옆으로 눕혀서 80 rpm 으로 혼합(shaking)시켜 미세조류와 고분자를 접촉시켰다. 대조군으로 pDMAEMA-EGDA 코팅 나일론 메쉬를 넣지 않고 배양액만 넣은 배양 플라스크를 같은 조건에서(80 rpm) 혼합(shaking)하였다. 48시간 후 샘플을 채취하여 엽록소(chlorophyll) 양을 측정하여 세포 생존력(cell viability)을 분석하고 (Ritche, 2006, Pruvost *et al.*, 2009), 나일리 레드(nile red, Sigma-Aldrich, St., 미국) 염색 후 Leica DM2500 현미경 (Leica, Solms, 독일)으로 지질 방출 여부를 관찰하였다.

[0048] 표 1은 pDMAEMA-EGDA가 코팅된 나일론 메쉬가 들어있는 플라스크와 들어있지 않은 플라스크의 CC-124, CC-400 균주의 엽록소 a(chlorophyll a) 농도를 나타낸 것이다.

표 1

Chlorophyll 농도 (μg/ml)	고분자 처리 없음	고분자 처리 있음
CC-124 (천연종, wildtype)	11.350	1.914
CC-400 (돌연변이, mutant)	5.456	0.705

[0050] 표 1의 결과에 따르면, pDMAEMA-EGDA가 코팅된 나일론 메쉬와 48 시간 동안 접촉한 클라미도모나스 레인하르티는 pDMAEMA-EGDA가 코팅된 나일론 메쉬와 접촉하지 않고 섞어주기만 한 것과 비교하여 천연종의 경우 83.1%, 돌연변이의 경우 87.1%의 엽록소가 줄어들었다. 이는 천연종, 돌연변이 둘 다 거의 완전히 세포들이 사멸되었음을 의미하며, 그 이유는 pDMAEMA-EGDA가 코팅된 나일론 메쉬에 코팅된 고분자의 작용 때문이다.

[0051] 도 2에 나타난 바와 같이, 천연종과 돌연변이 모두 pDMAEMA-EGDA가 코팅된 나일론 메쉬를 접촉시켜 처리했을 경우 색깔이 얼어져서 죽었음을 알 수 있었고, 원형을 이뤄야 할 세포 모양이 일그러진 타원 모양으로 변해 있음을 확인하였다. 그리고 (A)와 (C)에서 선명하게 보이는 세포벽이 (B)와 (D)에서는 관찰되지 않았다. 따라서 이는 세포벽이 파괴되었음을 의미한다. 또한 돌연변이의 경우 천연종보다 더욱 심하게 일그러져 완전히 터져 나온

세포도 발견되었고, 그 세포를 그림 (D) 에 흰색 동그라미로 표시하였다. 사진 (D) 에는 잘 드러나지 않지만, 자세히 관찰하였을 때 세포의 내용물이 바깥으로 나와 부유하고 있는 것도 관찰되었다.

[0052] 이는 천연종의 경우, pDMAEMA 말단에 있는 양전하를 띠고 있는 질소를 포함하는 3차 아민(tertiary amine)이 음전하를 띠고 있는 미세조류와 접촉하여 세포벽에서 전하 분열(charge disruption)을 발생시켜 세포벽이 파괴됨으로써, 지질 추출에 훨씬 용이한 상태가 된 것을 의미한다. 세포벽이 없는 돌연변이의 경우, 세포막이 완전히 파괴되어 세포 내의 지질을 비롯한 구성 물질들이 아예 바깥으로 방출되어, 아주 간단한 공정으로 추출이 가능한 상태가 된 것을 의미한다.

[0053] 도 3은 나일리 레드로 지질을 염색한 후 현미경으로 염색된 지질을 찍은 사진으로, 빨간색으로 빛나는 부분은 염록소이고, 노란색으로 빛나는 부분이 지질이다.

[0054] 도 3에 나타난 바와 같이, pDMAEMA-EGDA 나노 박막을 첨가함에 따라 빨간색 부분이 매우 줄어들어 관찰되었는데, 그 이유는 염록소가 감소했기 때문이다. 노란색 점은 세포 내에 존재하는 지질체(lipid body)이다. 진핵생물의 경우 지질을 지질체라는 형태로 저장하는데, 지질체는 막이 있는 세포소기관(organelle)이다. 천연종의 경우 그림 (B) 와 같이 고분자 처리를 해도 지질체가 여전히 세포 안에 들어있음이 관찰되었다. 돌연변이의 경우 지질체가 세포 밖으로 방출되었음을 알 수 있는데, 왜냐하면 한 세포는 두세 개의 지질체를 가지고 있는데 사진 (D)에서는 지질체가 하나씩 분산되어 있고 두세 개씩 뭉쳐있는 것을 관찰할 수 없기 때문이다.

[0055] pDMAEMA-EGDA 박막으로 처리를 하였을 때 클라미도모나스 레인하르티의 세포벽이 파괴되는 것을 확인하였다. 세포벽이 없는 돌연변이의 경우 완전히 세포가 터져 지질이 배양액 상으로 방출되었고, 천연종의 경우 지질이 세포 밖으로 방출되지는 않았지만, 세포벽이 매우 얇아져 세포의 모양이 일그러져있음이 관찰되었다. 따라서 고분자의 성질을 개질하고 반응 조건을 개선시킨다면 천연종도 지질이 방출되게 할 수 있을 것으로 보이며, 그러지 못하더라도 손쉽게 젖은 상태에서의 고효율 지질 추출을 위한 좋은 전처리로 활용할 수 있다.

[0056] 3-2 : 고분자 박막을 이용한 오란티오키트리움 에스피. KRS101(*Aurantiochytrium sp. KRS101*) 지질 추출

[0057] 50 ml self-standing tube에 오란티오키트리움 에스피. KRS101(*Aurantiochytrium sp. KRS101*) 배양액 35 ml 와 고분자(pDMAMS, p1-VP, pDMAEMA-EGDA)가 1000 nm 두께로 코팅된 나일론 메쉬를 2 cm × 5 cm 크기로 잘라서 함께 넣고 뚜껑을 잘 닫은 후, 옆으로 눕혀서 Green Sseriker shaker (Vision Scientific, 대한민국)에 부착시키고 200 rpm 으로 혼합(shaking)시켜 미세조류와 고분자를 접촉시켰다. 대조군으로 나일론 메쉬를 넣지 않은 배양액을 200 rpm 으로 혼합(shaking)시켰다. 그리고 30분, 2시간, 12시간, 24시간 후 샘플을 채취하여 보디피(BODIPY) 염색을 수행하여 Nikon Eclipse Ti confocal 현미경 (Nikon, 일본)으로 관찰한 후, 5 ml의 노멀 헥산(n-hexane, Sigma-Aldrich, St., 미국)을 넣고 부드럽게 섞어서 지질을 추출하였다.

[0058] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 2시간 이상의 처리시간에서 조건에 따른 차이점이 발견되었다. 나일론 메쉬가 없는 경우에는 24시간까지 세포의 모양이 원형으로 유지되었지만, pDMAMS, p1-VP, pDMAEMA-EGDA로 코팅한 나일론 메쉬를 넣고 혼합(shaking) 시킨 경우 2시간에서는 약간의 모양의 변화가 일어나 원형이 깨지기 시작했고, 12시간에는 세포벽이 파괴되어 내용물이 터져 나오는 현상이 관찰되었다. 초록색으로 염색된 지질이 세포벽 바깥으로 방출된 것을 확인할 수 있었다. 24시간이 되면 세포들이 서로 엉겨 붙어 있는 것이 관찰되는데, 이것은 방출된 세포의 내용물 때문에 주변의 세포들이 달라붙는 것으로, 현미경 관찰 상으로 고분자 종류에 따른 차이점은 뚜렷하게 관찰되지는 않았지만, 고분자 코팅 나일론 메쉬 처리를 하지 않은 대조군과는 모두 확연한 세포벽 파괴 성능을 보였다.

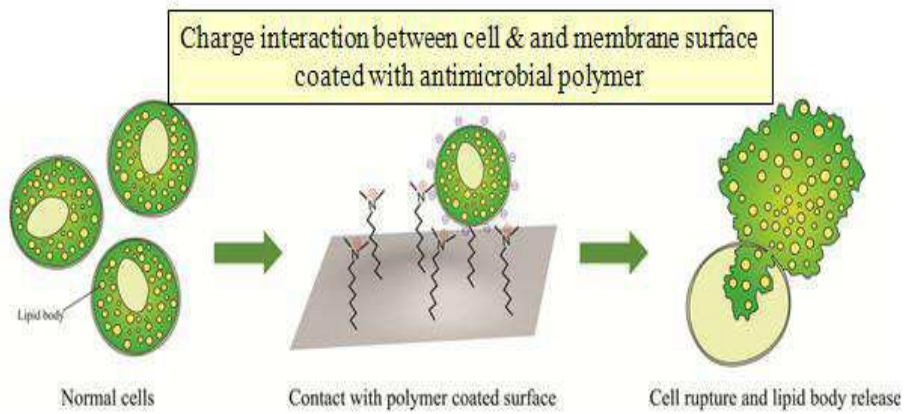
[0059] 도 5에 나타난 바와 같이, 시간이 경과할수록 지질의 추출량은 증가하고, pDMAMS로 코팅한 나일론 메쉬를 넣었을 경우에, 8mg/L의 최대 지질 추출량을 수득하였다.

[0060] 3-3: 고분자 박막을 이용한 오란티오키트리움 에스피. KRS101(*Aurantiochytrium sp. KRS101*) 지질 추출을 위한 전처리 공정실험(세포벽과 세포막의 파괴)

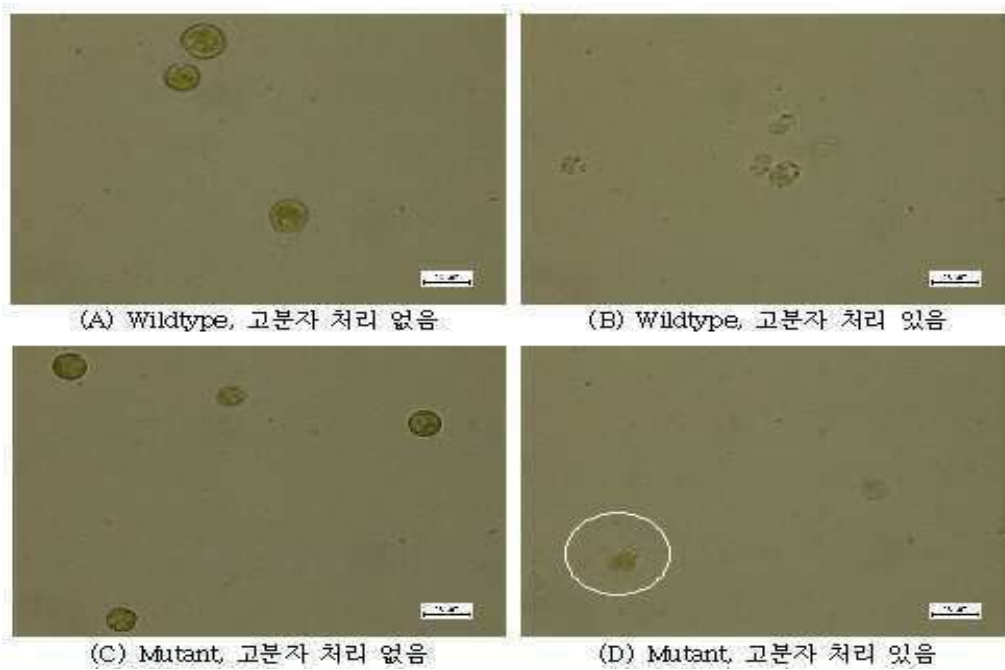
- [0061]
- [0062] 본 실험에 관한 전반적인 프로토콜은 도 6에 도시하였다.
- [0063] 50ml self-standing tube에 오란티오키티리움 에스피. KRS101(*Aurantiochytrium sp. KRS101*) 배양액 35 ml와 고분자(pDMAMS, p1-VP, pDMAEMA-EGDA)가 1000 nm 두께로 코팅된 나일론 메쉬를 2 cm × 5 cm 크기로 잘라서 함께 넣고 뚜껑을 잘 닫은 후, 옆으로 눕혀서 Green Sseriker shaker (Vision Scientific, 대한민국)에 부착시키고 200 rpm 으로 혼합(shaking)시켜 미세조류와 고분자를 접촉시켰다. 대조군으로 나일론 메쉬를 넣지 않은 배양액을 200 rpm 으로 혼합(shaking)시켰다. 그리고 3시간, 6시간, 12시간, 24시간 후 샘플을 채취하여 보디피(BODIPY) 염색을 수행하여 Nikon Eclipse Ti confocal 현미경 (Nikon, 일본)으로 관찰한 후, 5 ml의 노멀 데칸(n-decane, Sigma-Aldrich, St., 미국)을 넣고 부드럽게 섞어서 지질을 추출하였다. 유기용매에 의한 추가적인 세포 데미지 없이 액상에 터져 나온 지질만을 회수하여 지질의 무게를 측정하였다.
- [0064] 도 8에서 보는 바와 같이, 시간에 따라서 지질 추출량이 증가하였으며(빨간 곡선), 양이온성 고분자의 작용이 확인되었다. 도 7의 현미경 사진에서도 역시 고분자 접촉에 의한 세포 파괴(cell rupture)가 관찰되었으며, 응집 현상은 세포 파괴에 의해 끈적한 내부 물질이 밖으로 노출되면서 세포끼리 엉겨 붙게 되는 작용으로 해석된다. 고분자에 의한 세포 파괴량은 약 12시간에서 포화되었다. 이 포화 시점은 세포 농도(cell concentration), 고분자량(polymer dosage), 혼합속도(shaking rate), 고분자 구조(제타 퍼텐셜, zeta potential) 등의 변수에 달렸다. 또한, 전체 지질 함량의 10~15%에 해당하는 지질만이 터져 나왔는데, 이것은 응집 현상에 의해 응집체(agglomerate) 내부의 세포가 고분자와 접촉할 수 없게 되는 점, 그리고 고분자 코팅 멤브레인 자체의 처리 용량 한계 등에 의한 것으로 생각된다.
- [0065] 실시예 4 : 바이오디젤 제조
- [0066] 실시예 3-2에서 3가지 양이온성 고분자 박막을 이용하여 추출된 오란티오키티리움 에스피. KRS101(*Aurantiochytrium sp. KRS101*) 유래 지질을 노멀 헥산(n-hexane, Sigma-Aldrich, St., 미국)을 첨가하여 상을 분리시키고, 상층 노멀 헥산 층을 분리해 질소 분위기 하에서 노멀 헥산을 증발시키고 남은 지질을 클로로포름(chloroform, Sigma-Aldrich, St., 미국)에 용해시켜 황산과 메탄올(Sigma-Aldrich, St., 미국)을 첨가하여 바이오디젤(FAME)로 전환시켜 gas chromatography로 정량 분석했다.
- [0067] 그리고 물 층에 남아있는 미세조류를 원심분리로 수확하여 dry oven에서 건조시켜, chloroform:methanol 2:1 혼합용매로 지질을 추출하고 황산과 methanol로 지질을 바이오디젤로 전환시켜 Agilent 6890 gas chromatography (Agilent, Santa Clara, 미국)로 정량 분석하였다. 그 결과, 미세조류 8g에 대하여, 바이오디젤의 생산량이 3.7mg인 반면에, pDMAMS 박막 추출인 경우, p1-VP 박막 추출인 경우 및 pDMAEMA-EGDA 박막 추출인 경우, 바이오디젤의 생성량은 각각 8mg, 7mg 및 6.7mg이었다.
- [0068] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

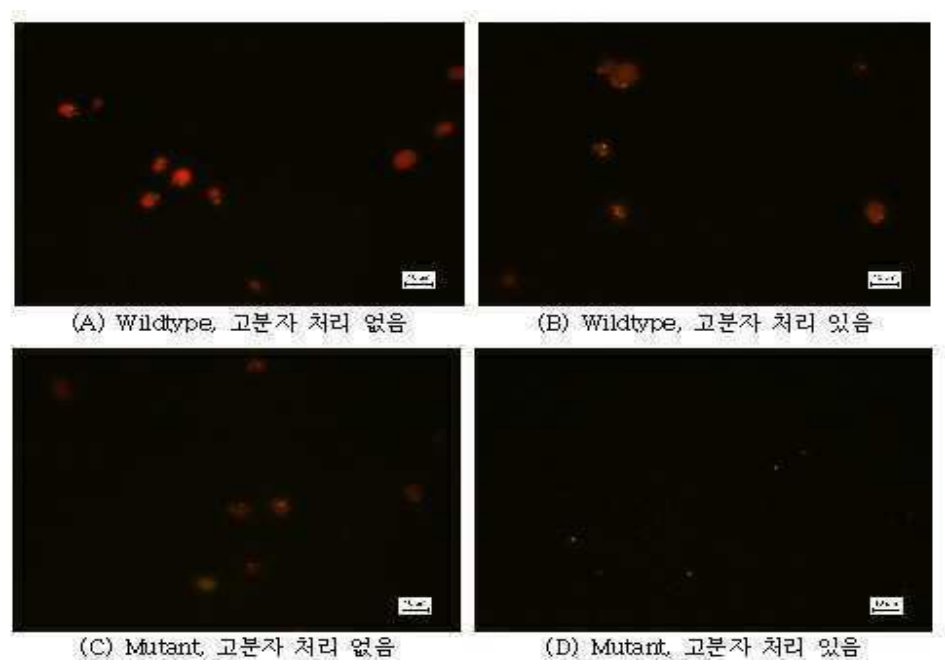
도면1



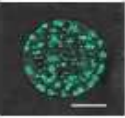
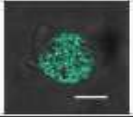
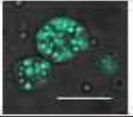
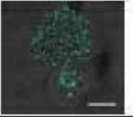
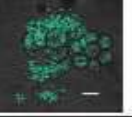
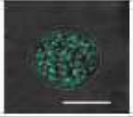
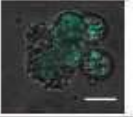
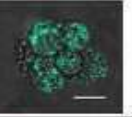
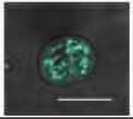
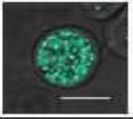
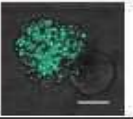
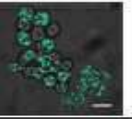
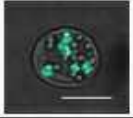
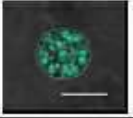
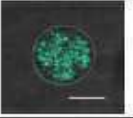
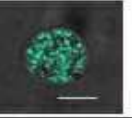
도면2



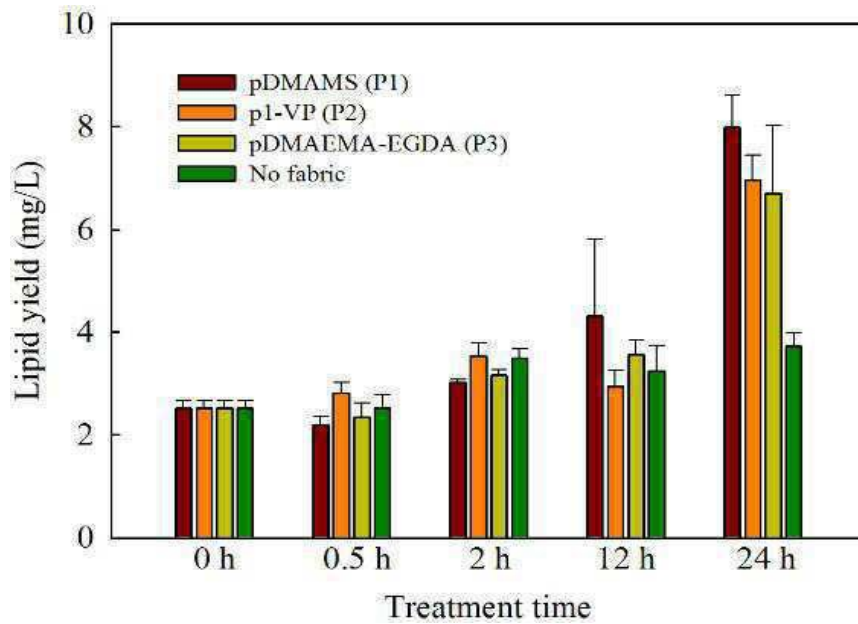
도면3



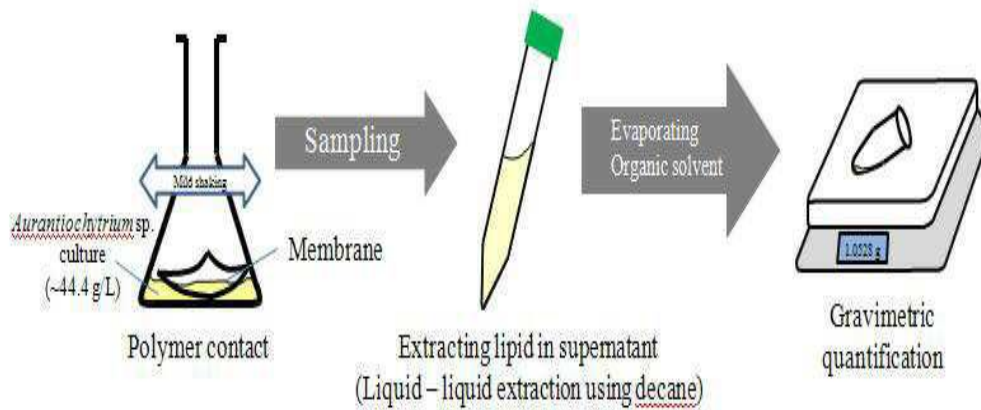
도면4

	초기	30분	2시간	12시간	24시간
pDMAMS					
p1-VP					
pDMAEMA-E GDA					
Nylon mesh 없음					

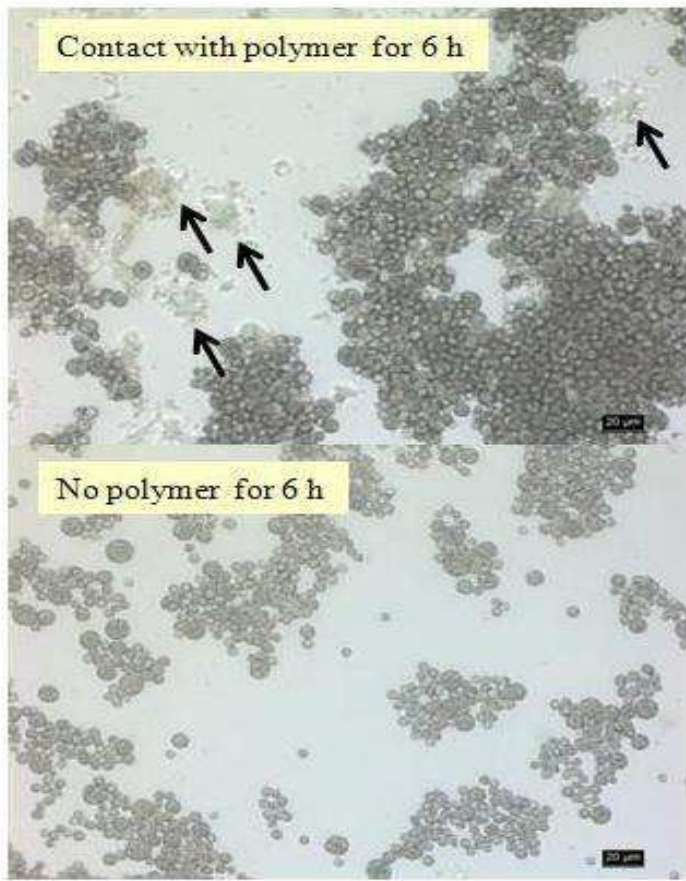
도면5



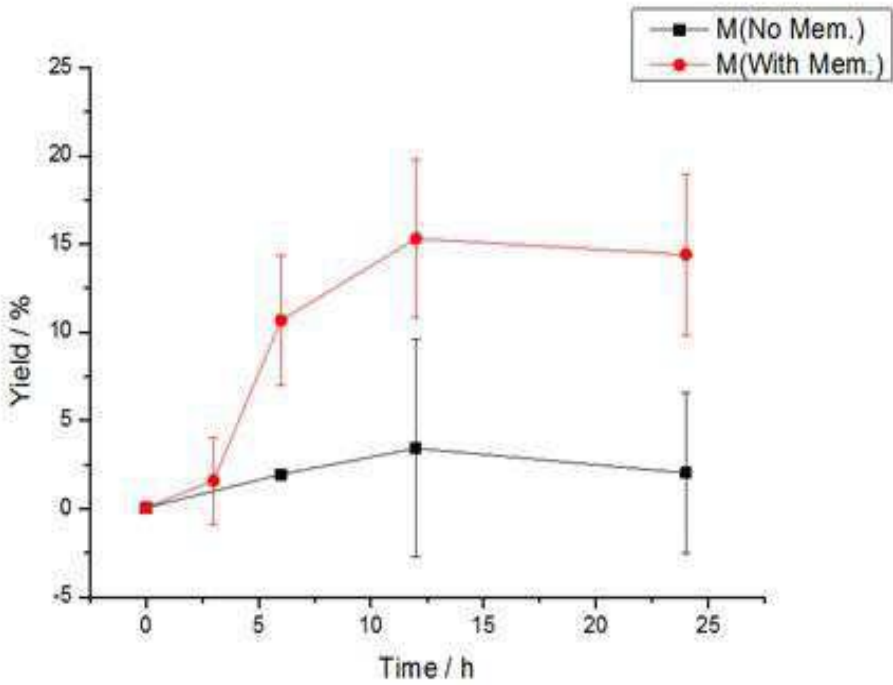
도면6



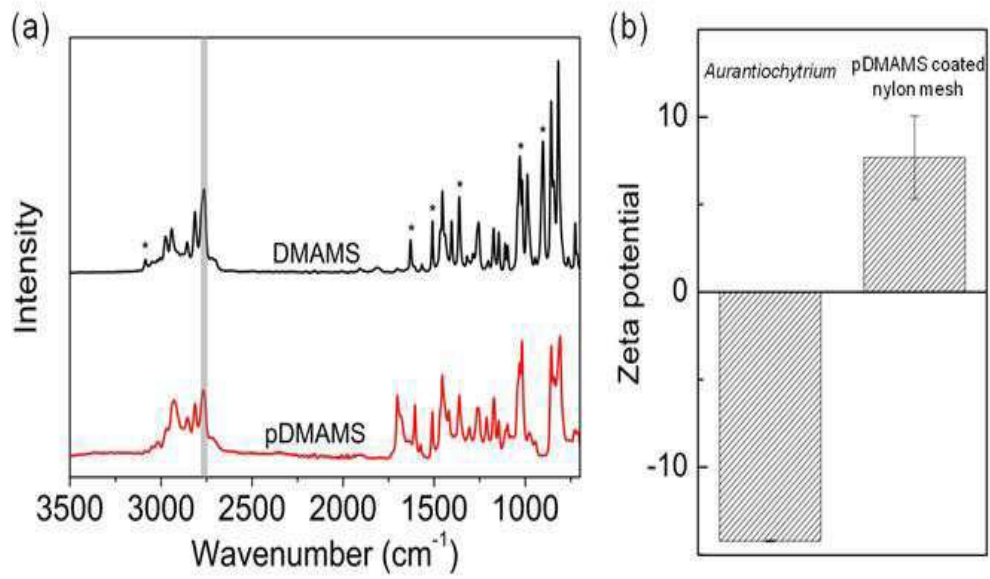
도면7



도면8



도면9



도면10

