

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0019616 (43) 공개일자 2014년02월17일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 1/12 (2006.01) C12P 7/64 (2006.01) (21) 출원번호 10-2012-0085961 (22) 출원일자 2012년08월06일 심사청구일자 2012년08월06일		(71) 출원인 인하대학교 산학협력단 인천광역시 남구 인화로 100, 인하대학교 (용현동) (72) 발명자 이철균 서울 서초구 신반포로 270, 104동 801호 (반포동, 반포자이) 성동호 서울 영등포구 양평로30길 51, 102동 1605호 (양평동6가, 한솔아파트) (74) 대리인 김남식, 양기혁, 한윤호, 이인행

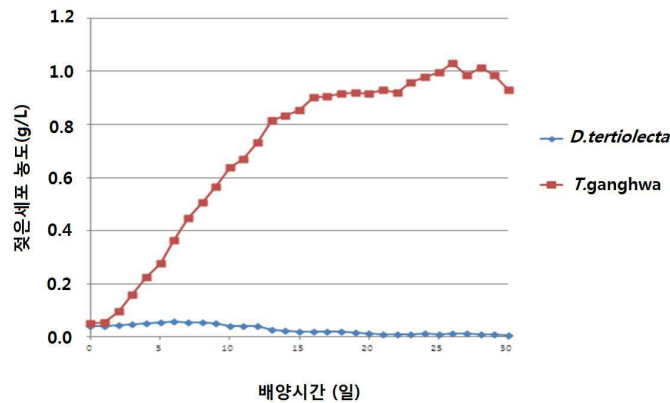
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 신규 테트라셀미스 균주 및 이를 이용한 바이오디젤의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 0~37℃의 온도조건에서 성장하는 신규 테트라셀미스 강화(*Tetraselmis sp.* Ganghwa) 균주(기탁번호 KCTC 12236BP) 및 상기 균주를 이용한 바이오디젤 생산 방법을 제공한다.

대표도 - 도4a



(72) 발명자

임상민

인천 부평구 부흥로 246, 21동 1103호 (부평동, 동아2단지아파트)

배재한

인천 남구 인하로77번길 28, 나동 201호 (용현동, 새한아파트)

특허청구의 범위

청구항 1

0~37℃의 온도조건에서 성장하는 신규 테트라셀미스 강화(*Tetraselmis* sp. Ganghwa) 균주(기탁번호 KCTC 12236BP).

청구항 2

제1항에 있어서,

서열번호 1의 핵산서열을 갖는 rDNA를 갖는, 신규 테트라셀미스 균주.

청구항 3

제1항의 신규 테트라셀미스 균주를 유효성분으로 함유하는 바이오디젤 생산용 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 신규 테트라셀미스 균주를 배양배지에 넣고 광조사 하에 배양하는 배양단계;

상기 배양된 균주를 회수하는 균주 회수단계; 및

회수된 균주에 촉매를 가하여 상기 균주 내에 존재하는 지방산 글리세롤을 지방산 에스터로 전환시키는 지방산 에스터 전환단계를 포함하는 바이오디젤의 생산방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 균주 회수단계는 중력침전과 중력여과만을 사용하여 젖은 균체를 수득하는, 바이오디젤의 생산방법.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 지방산 에스터 전환단계 후 형성된 조바이오디젤로부터 바이오디젤을 정제하는 바이오디젤 정제단계가 추가로 포함되는, 바이오디젤의 생산방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 신규 균주 및 이를 이용한 바이오디젤의 제조방법에 관한 것으로서, 더 상세하게는 신규 테트라셀미스 균주 및 이를 이용한 바이오디젤의 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 화석에너지의 다량사용으로 인한 이산화탄소의 발생은 지구온난화의 원인이 되고 있으며, 화석에너지의 고갈시대를 대비한 지속가능한 친환경에너지로 바이오 에너지의 개발이 필요하다. 바이오 에너지 중에 바이오디젤은 내연기관인 디젤기관의 원료로서 널리 사용되고 있으며, 친환경연료로서 각광 받고 있는 연료이다. 그러나 제조 원료로서 지방산 글리세롤에스터, 지방산 또는 식물과 동물유래의 지질이 사용되고 있지만, 그 지질은 대부분 식량자원이기 때문에 바이오디젤의 대량생산이 식량의 고갈문제를 새로이 유발시킬 위험성이 있다. 따라서 에너지문제도 해결하고 식량문제도 발생시키지 않을 새로운 지질자원의 개발이 필요하다. 지질 생산자원 중에 미세조류는 태양빛과 이산화탄소 및 물을 사용하여 광합성을 하여 유기물, 특히 지질을 생산하는 능력이 우수하기 때문에 미래 바이오디젤의 생산원으로 기대되고 있어 많은 연구가 진행되고 있다. 미세조류로부터 경제적이고 품질이 우수한 바이오디젤을 생산하기 위해서는 우수균주의 확보가 가장 중요하며 배양된 미세조류로부터 바이

오디젤을 제조하는 기술 또한 필요하다. 미세조류는 균주에 따라 생산하는 지질의 특성이 다르기 때문에 미세조류 지질을 에너지 및 건강식품자원으로 활용하기 위해서는 다양한 생산균종을 활용하여 생산하는 것이 필요하다. 특히, 경제적으로 바이오디젤을 생산하기 위해서는 옥외에서 배양하는 것이 운전비용과 설비비가 적게 들어 유리하지만, 미세조류는 일반적으로 23℃ 근방의 온도에서 가장 잘 생육하고 추운 기후에서는 생육이 어려운 성질이 있다. 따라서 추운 계절에도 옥외에서 배양하여 지질을 효과적으로 생산하기 위해서는 낮은 온도에서 생육활성이 우수한 미세조류가 필요하다. 북극이나 남극에도 미세조류가 존재하며 낮은 온도에서 생육하지만 전반적으로 극지 미세조류는 차가운 온도에서 생육할 뿐 성장속도가 낮고 일반 배양조건에서 생육이 잘 안되어서 극지균주 자체를 옥외배양의 거친 환경에서 지질생산균주로 사용하기에는 어려움이 있다. 특히 대한민국과 같이 사계절이 뚜렷한 지역에서의 봄, 가을 및 겨울과 같이 미세조류를 배양하기에 불리한 기온에서 생육이 잘 되는 미세조류 종의 개발이 필요하다.

[0003] 대한민국 공개특허 제2011-0125576호에서는 북극해양에서 분리한 클라미도모나스 세포주를 개시하고 있다. 상기 균주는 저온에서 자라며, 지질함량이 높은 특징을 가지고 있지만, 저온에서 생존하는 정도가 아닌 성장속도가 빠르며, 옥외 열린계에서 배양과 같이 타 미생물에 의해 오염가능성이 높으며 밤낮의 온도 차이가 큰 환경에서 생존력이 우수한 균주가 필요하다. 또한, 미세조류별 바이오디젤의 생산특성이 다르므로 다양한 종의 미세조류의 개발이 필요하다. 김철원 등(J Aquaculture, 11(2):231-240, 1998)은 대량배양에 적합한 테트라셀미스종을 선택하기 위해 5종의 테트라셀미스를 시험하였지만 저온인 6℃에서는 거의 성장이 되지 않고 바닥에 가라앉아 세포가 바닥에 가라앉아 뭉쳐져 있다고 보고하고 있다. 미세조류로부터 바이오에너지를 안정적으로 생산하기 위해서는 차가운 온도에서도 생육이 잘되며 배양장치가 발생하는 기계적인 전단응력과 같은 스트레스에 적응성이 우수하여 차가운 계절에 옥외에서 주위환경에 영향을 적게 받으며 안정적으로 바이오디젤을 생산할 수 있는 미세조류 종의 개발이 필요하다. 또한 미세조류를 배양액으로부터 분리하는 방법은 통상 원심분리나, 필터프레스 여과와 같은 동력을 사용한 방법이 주로 이용되나, 배양액의 부피가 많아 동력이 다량 소요되어 균체를 회수하는 단계가 원가가 많이 소요되어, 경제적인 측면에서 개선이 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 포함하여 여러 문제점들을 해결하기 위한 것으로서, 다양한 환경조건 하에서 안정적으로 바이오디젤을 대량생산할 수 있는 신규 테트라셀미스 균주를 제공하는 것을 목적으로 한다. 그러나 이러한 과제는 예시적인 것으로, 이에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

과제의 해결 수단

[0005] 본 발명의 일 관점에 따르면, 0~37℃의 온도범위에서 성장하는 신규 테트라셀미스 강화(*Tetraselmis sp.* Ganghwa) 균주(기탁번호 KCTC 12236BP)가 제공된다.

[0006] 상기 균주는 서열번호 1의 핵산서열을 갖는 rDNA를 갖는다.

[0007] 본 발명의 일 실시예에 따른 신규 테트라셀미스 강화 균주는 동속의 테트라셀미스 수에시카 균주에 비하여, 생육가능한 온도 범위가 매우 넓으며, 야외에서도 생육이 가능하다. 상술한 바와 같이, 미세조류는 온도변화, 환경 스트레스에 의하여 생육이 용이하지 않기 때문에, 본 발명의 일 실시예에 따른 신규 테트라셀미스 강화 균주는 이러한 문제를 해결하며, 산업적 활용 가능성이 매우 우수하다.

[0008] 본 발명의 다른 관점에 따르면, 상기 신규 테트라셀미스 강화 균주를 유효성분으로 함유하는 바이오디젤 생산용 조성물이 제공된다.

[0009] 본 발명의 다른 관점에 따르면, 상기 신규 테트라셀미스 강화(*Tetraselmis sp.* Ganghwa) 균주를 배양배지에 넣고 광조사 하에 배양하는 배양단계; 상기 배양된 균주를 회수하는 균주 회수단계; 및 회수된 균주에 촉매를 가하여 상기 균주 내에 존재하는 지방산 글리세롤을 지방산 에스터로 전환시키는 지방산 에스터 전환단계를 포함하는 바이오디젤의 생산방법이 제공된다.

[0010] 상기 바이오디젤의 생산방법에 있어서, 상기 균주 회수단계는 중력침전과 중력여과만을 사용하여 젖은 균체를 수득할 수 있다. 상기 중력침전과 중력여과 단계는 기계력을 사용하지 않고, 자연적인 중력만을 이용하여 침전 및 여과시키는 단계를 의미하며, 경제적인 측면에서 원심분리 및 필터프레스 등의 여과 방법에 비하여 효율적이다.

[0011] 상기 바이오디젤의 생산방법에 있어서, 상기 지방산 에스터 전환단계 후 형성된 조바이오디젤로부터 바이오디젤을 정제하는 바이오디젤 정제단계가 추가로 포함될 수 있다.

[0012] 본 발명자는 저온에서 빠른 속도로 성장하며 옥외배양장치에 적응성이 우수한 균주를 개발하기 위하여 겨울철 대한민국 강화도 바닷가에서 생육하는 야생 미세조류를 분리하였다. 그 중 차가운 바닷가에서 생육이 우수한 미세조류를 분리하였으며 그 중에 생육활성이 우수하고, 지질 생산성이 우수한 균주를 선별하고 동정을 한 결과 테트라셀미스 속으로 밝혀져 테트라셀미스 강화(*Tetraselmis sp.* Ganghwa) 균주로 명명하였으며, 봄철에 옥외배양장의 순환수조광생물 반응기를 사용하여 대량배양 시험한 결과 저온 생장성이 종래 동속 균주보다 우수하고, 저온부터 37℃의 고온에서도 잘 성장하는 등 생장온도 스펙트럼이 넓어 옥외배양 조건 및 시설에 적응성이 우수할 뿐만 아니라, 균체 회수 시 자연 중력침전이 양호하고 자연중력 여과가 잘되기 때문에, 원심분리 등의 에너지 투여과정이 필요 없는 경제적인 바이오디젤 제조가 가능한 것으로 판정되어 생명공학연구원(KCTC)에 2012년 7월 4일자로 특허기탁하였다(기탁번호 KCTC 12236BP).

발명의 효과

[0013] 상기한 바와 같이 이루어진 본 발명의 일 실시예에 따르면, 저온 생장성이 좋고 온도 스펙트럼이 넓어서 한국과 같은 기후조건에서 옥외배양이 가능한 미세조류를 제공함으로써, 바이오디젤을 대량생산할 수 있다. 또한 본 발명의 일 실시예에 따른 신규 테트라셀미스 강화 균주는 균체 회수 단계에서 별도의 동력을 사용하지 않고 자연 중력만을 사용하여 균체를 회수함으로써 경제적으로 균체를 회수할 수 있다. 물론 이러한 효과에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 신규 테트라셀미스 균주인, *Tetraselmis sp.* Ganghwa를 현미경으로 관찰한 사진이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 신규 *Tetraselmis sp.* Ganghwa의 18S rDNA의 서열(서열번호 1)이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 신규 *Tetraselmis sp.* Ganghwa의 10℃(도 3a) 및 5℃(도 3b)에서의 생육 특성을 나타낸 그래프이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 신규 *Tetraselmis sp.* Ganghwa의 옥외배양 적응성을 관찰한 그래프(4a)와 옥외배양장치(4b)이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 이하, 실시예 및 실험예를 통하여 본 발명을 더 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예 및 실험예에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있는 것으로, 이하의 실시예 및 실험예는 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이다.

[0016] 실시예 1: 균주의 분리

[0017] 대한민국 강화도 인근 해변에서 겨울철에 해수를 채취하여 냉암소에 보관하고, 미세조류 분리에 사용하였다. 상기 채취한 해수 시료를 0.45 μm의 여과지를 사용해 여과하여 세포를 농축시킨 후, 이를 멸균된 MBL+f/2 배지에 다시 분산시켰다. 상기 MBL+f/2 배지는 비타민과 규소 성분을 포함하지 않으며, 그 조성은 표 1과 같다. 상기 분산된 세포를 한천 1.5%로 고체화한 MBL+f/2 한천 평판배지에 도말하여, 10℃에서 50 μmol/m²/sec의 광도로 형광등을 연속적으로 조사하면서 3 주간 배양하여 미세조류의 군락을 형성시켰다.

[0018] 첫 번째 배양에서는 미세조류 뿐만이 아니라 다른 미생물들도 함께 군락을 형성하였다. 그 중 빠른 성장성을 보이는 군락들을 백금미(platinum loop)를 사용하여 고체 배지에 선형도말하여 미세조류만을 분리하는 과정을 3 회 반복하여, 순수한 미세조류 군락들을 얻었다.

[0019] 상기 수득한 순수한 미세조류 군락들을 1 ml의 MBL+f/2 배지에 접종하고 10℃에서 50 μmol/m²/sec의 광도로 형광등을 연속적으로 조사하면서 24웰 플레이트에서 2주간 배양하였다. 배양한 균주 중에 성장성이 우수한 균주를 선택하고, 이를 100 ml 부피까지 규모를 키워서 10℃에서 50 μmol/m²/sec의 광도를 연속적으로 조사하면서,

100 rpm으로 교반시켜 세포를 배양하였다. 그 후, 주기적으로 계대배양을 실시하였다.

표 1

MBL+f/2 배지 조성(1 L 기준)

화합물	사용량
NaNO ₃	0.075 g
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	0.005 g
Trace metal solution	1 ml
Artificial seawater (MBL)	1 L
Trace metal solution (1 L 기준)	
FeCl ₃ 6H ₂ O	3.15 g
Na ₂ EDTA2H ₂ O	4.36 g
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.0098 g
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.0063 g
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.022 g
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.01 g
MnCl ₂ 4H ₂ O	0.018 g
Artificial seawater (MBL, 1 L 기준)	
NaCl	24.7 g
KCl	0.66 g
MgCl ₂ 6H ₂ O	8.48 g
CaCl ₂ 2H ₂ O	1.9 g
MgSO ₄	3.07 g
NaHCO ₃	0.18 g

실시예 2: 균주의 동정

상기 실시예 1에서 분리하고, 배양한 미세조류를 동정하기 위하여, 상기에서 선별된 균주에 대한 형태학적 관찰과 18S rDNA의 염기서열 결정 및 분석 실험 등을 수행하였다.

2-1: 18S rDNA의 염기서열

제노믹 DNA 분리키트(Qiagen 사의 DNeasy Plant Mini Kit)를 사용하여 배양 세포로부터 게놈 DNA를 추출하였으며, 이를 이용하여 18S rDNA의 염기서열 분석을 통해 균주를 동정하고자 하였다.

진핵세포의 18S rDNA에 대해서 표 2에 표기된 프라이머를 사용하여 해당 유전자의 단편을 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 통해 증폭시켰다. PCR은 다카라사의 중합효소(PrimeStar HS DNA

Polymerase)를 사용하였고, 주형으로는 40 ng의 추출한 게놈 DNA를 사용하였다. PCR 조건으로는 초기변성을 94℃에서 3분간 실시한 후, 98℃에서 10초, 50℃에서 5초, 72℃에서 30초의 반응을 30 회 반복하였고, 마지막 DNA 신장은 5 분간 실시하였다.

[0026] 증폭된 DNA 단편을 전기영동을 통해 분리한 결과 약 700 bp에서 PCR 산물을 확인할 수 있었으며, DNA 단편 정제 키트(Qiagen 사의 MinElute Gel Extaction Kit)를 이용하여 겔로부터 해당 DNA 단편을 추출, 정제하여 서열분석을 하였다.

[0027] 그 결과로서 그림 1과 같이 685 bp의 분리한 균주의 18S rDNA 단편의 염기서열(서열번호 1)을 확인할 수 있었다. 이 염기서열을 대상으로 하여 NCBI의 BLAST를 사용하여 상동성을 검사한 결과 *Tetraselmis striata*와 *T. carteriiformis*를 포함한 *Tetraselmis*의 여러 종들과 100% 서열이 일치한 결과를 통하여 *Tetraselmis* 속에 속하는 균주로 동정되었다.

[0028] 2-2: 형태학적 관찰

[0029] 상기 실시예 1에서 분리한 균주를 현미경을 이용하여 관찰한 결과, 약 15 μm의 구형이며 녹색형광을 내는 균주로 형태적으로 *Tetraselmis sp.* 와 일치하는 것을 확인할 수 있었다(도 1 참조).

[0030] 따라서, 상기 균주를 테트라셀미스 균주 강화(*Tetraselmis sp.* Gangwha)로 명명하고, 한국생명공학연구원 생물자원센터에 2012년 7월 4일자로 기탁하였다 (기탁번호: KCTC 12236BP).

표 2

[0031] 18S rDNA 단편의 PCR을 위해 사용된 프라이머

서열번호 2	정방향 프라이머	5-GTCAGAGGTGAAATTCTTGGATTTA-3
서열번호 3	역방향 프라이머	5-AGGGCAGGGACGTAATCAACG-3

[0032] 실험예 1: 테트라셀미스 sp.강화의 저온에서의 성장성

[0033] 본 발명의 일 실시예에서 분리 및 동정한 *Tetraselmis sp.* Gangwha의 저온에서의 성장성을 확인하였다. 이때, 두날리엘리 터티올렉타 엘비 999 균주(*Dunaliella tertiolecta* LB 999)와 테트라셀미스 수에시카 균주(*Tetraselmis suecica*)를 대조균으로 사용하였다.

[0034] 스폰지로 마개를 한 250 ml 삼각플라스크를 사용하였으며, MBL+f/2 배지 100 ml를 사용하여 초기 젖은 세포를 0.1 g/L 농도로 접종하고, 10℃에서 50 μmol/m²/sec의 광도로 형광등을 연속적으로 조사하면서 120 rpm으로 진탕하며 배양 하였다. 상기 MBL+f/2 배지의 조성은 표 1에 기재된 바와 같다.

[0035] 배양 4일 후, 쿨터 카운터(모델 multi-sizer, Coulter Electronics, Inc., Hialeah, FL, U.S.A.)를 사용하여 세포 농도를 측정한 결과, 테트라셀미스 sp. 강화는 0.68 g/L로 생육되었으나, 테트라셀미스 수에시카와 두날리엘라 테티올렉타는 각각 0.15 g/L와 0.24 g/L로 생육이 저조하였다(도 3a).

[0036] 이어, 본 발명자는 온도 조건을 5℃로 변경하고, 그 외의 조건은 모두 동일하게 하여 본 발명의 일 실시예에 따른 *Tetraselmis sp.* Gangwha의 저온에서의 성장성을 확인하였다. 대조균으로는 두날리엘리 터티올렉타 엘비 999 균주(*Dunaliella tertiolecta* LB 999)만을 이용하였다. 그 결과, 5℃의 온도에서도 생육이 우수하였으며, 대조균에 비하여 약 6배 가량의 우수한 생육정도를 나타냈다(도 3b).

[0037] 실험예 2: 테트라셀미스 sp. 강화의 옥외 배양적응성

[0038] 본 발명의 일 실시예를 통하여 분리 및 동정된 테트라셀미스 sp. 강화를 순환수조광생물반응기를 이용하여 옥외에서 배양함으로써, 옥외 배양적응성을 관찰하였다. 상기 순환수조광 생물반응기는 지름 1.5 m에 높이 1 m의 원통형으로 원통은 투명한 재질이며, 원통하단은 완만한 경사를 가지고 중앙으로 집중되는 깔대기 형상을 갖는다. 또한, 하단중앙에 순환배양액 유출구가 있으며, 상기 순환배양액 유출구를 통하여 나간 배양액이 다시 배양액 중으로 순환배양액 유입구를 통해 토출되며 순환하는 장치를 포함한다. 또한, 순환배양액 유출구에 혼합기체를 직접 주입할 수 있도록 기체주입관이 구비되어 있다. 이때, 두날리엘리 터티올렉타 엘비 999 균주(*Dunaliella tertiolecta* LB 999)를 대조균으로 사용하였다.

[0039] 공기와 이산화탄소 혼합기체를 기체주입관을 통해 순환배양액 유출구를 통해 직접 주입하며 동시에 배양액도 순환배양액 유출구를 통해 연속적으로 배출시킨 후 순환배양액 유입구를 통해 수조 내로 분사하며 순환하는 방법으로 배양하였다. 이때, 배지는 대한민국 인천 앞바다에서 채취한 바닷물을 모래여과로 불순물을 제거한 자연해수에 f/2 배지를 혼합한 것을 사용하였으며, 각각 1000 L를 혼합하여 사용하였고 f/2 배지의 조성은 표 3과 같다.

표 3

[0040] f/2 배지 조성 (1L 기준)

화합물	사용량
NaNO ₃	0.075 g
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	0.005 g
Trace metal solution	1 mL
Trace metal solution (1 L 기준)	
FeCl ₃ 6H ₂ O	3.15 g
Na ₂ EDTA2H ₂ O	4.36 g
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.0098 g
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.0063 g
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.022 g
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.01 g
MnCl ₂ 4H ₂ O	0.018 g

[0041] 배양은 대한민국 인천시 용현동 인하대학교 내의 옥외에서 2012년 4월 12일부터 30일간 배양하였으며, 비가 올 경우에는 투명 비닐 덮개로 덮어서 빗물이 들어가지 않게 하였다. 테트라셀미스 sp. 강화와 두날리엘라 터티올렉타 엘비 999의 접종 후 초기농도는 각각 젖은 세포로 0.05 g/L 이며, 이때 주입한 혼합기체로는 2% 이산화탄소가 포함된 공기를 사용하였으며 분당 100 L씩 연속적으로 공급하였다. 배양액 중 세포농도는 쿨터 카운터(모델 multi-sizer, Coulter Electronics, Inc., Hialeah, FL, U.S.A.)로 측정하였다.

[0042] 배양기간 중 배양액의 수온은 배양 첫날이 가장 낮았으며 점진적으로 올라가서 배양 1일차, 10일차, 20일차, 30일차 아침 수온이 각각 6℃, 16℃, 18℃, 21℃이었으며, 한낮의 수온은 13℃, 20℃, 21℃, 29℃이었다. 배양 생육결과 두날리엘라 터티올렉타는 거의 생육하지 못하고 사멸하였다. 반면, 테트라셀미스 sp. 강화는 매우 잘 성장하여 차가운 기온과 자연해수 조건 및 순환수조광생물반응기의 전단응력 조건 등의 옥외 배양 조건에서 생육활성을 유지하는 생육성이 우수한 균종으로 판명되었다.

[0043] **실험예 3: 테트라셀미스 sp. 강화를 이용한 바이오디젤의 제조**

[0044] 순환수조광생물반응기에서 30일간 배양한 테트라셀미스 sp. 강화 균주를 회수하기 위하여 순환수조광생물반응기의 순환을 멈추고 3시간 정지하였다. 세포가 가라앉아 배양액의 상층부는 투명하게 되었으며, 세포 침전액은 약 100 L 정도였다. 투명한 상등액만 사이폰으로 제거하고, 남은 세포 침전액을 무명천을 여과포로 사용하여 하룻밤 자연중력여과를 하였다. 그 후, 다시 물로 세척한 다음 하룻밤 자연중력여과를 하여서 젖은 세포를 932 g을 수득하였다. 세포를 판형용기에 담아 -40℃에 동결한 다음 동결건조하여 307 g의 동결건조 균체를 수득하였다.

[0045] 동결건조 균체 110 g에 300 mL 메탄올과 5 mL 진한 황산을 넣고 가열하여 6시간동안 환류 교반을 한 다음 냉각하였다. 그 후, 여과한 여액을 250 mL n-헥산으로 3회 추출한 후, n-헥산층을 농축하여 조바이오디젤 19.1 g을

얻었다. 조바이오디젤을 고진공하에서 분별 증류하여 바이오디젤 13.2 g을 수득하였다.

[0046] 테트라셀미스 sp. 강화로부터 추출한 바이오 디젤 지방산의 조성은 C16:0 21.9%, C18:1 15.9%, C18:2 20.4, C18:3 8.6% 로 4가지 지방산성분이 주요 조성을 이루는 바이오디젤이다.

[0047] 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.

수탁번호

[0048]

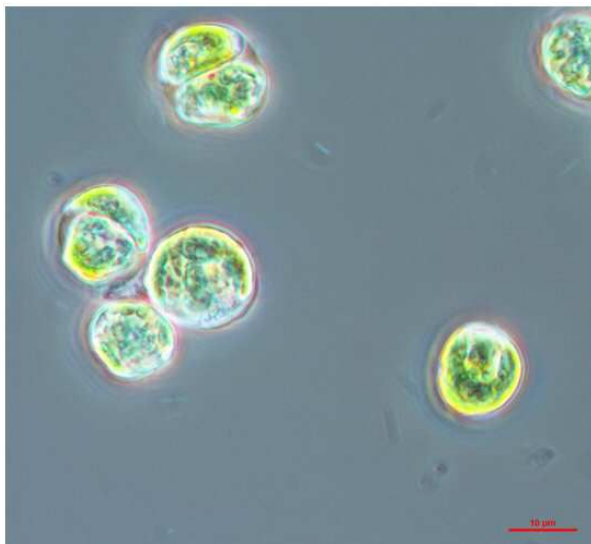
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC12236BP

수탁일자 : 20120704

도면

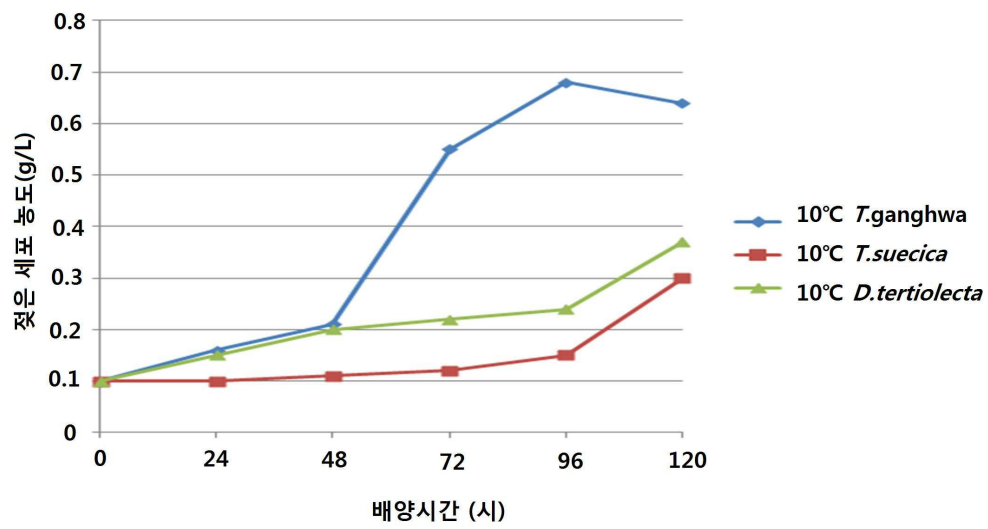
도면1



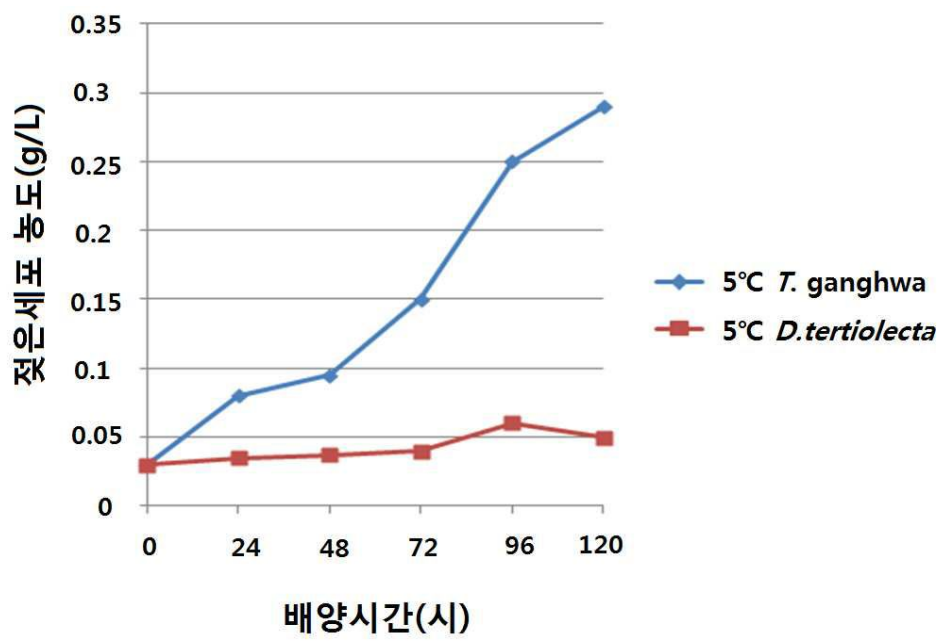
도면2

1	TGAAAGACGAACTTCTGCGAAAGCATTGTCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAA	60
61	GTTGGGGGCTCGAAGACGATTAGATACCGTCCTAGTCTCAACCATAAACGATGCCGACTA	120
121	GGGATTGGCAGACGTTTTTTTGATGACTCTGCCAGCACCTTATGAGAAATCAAAGTTTTT	180
181	GGGTTCCGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACC	240
241	ACCAGGCGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACCTACCAGGTCCAGA	300
301	CATAGTGAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGC	360
361	CGTTCTTAGTTGGTGGGTTGCCTTGTGAGGTTGATCCGGTAACGAACGAGACCTCAGCC	420
421	TGCTAAATAGTTACTCCTACTTTGGTAGGAGGTGAACTCTTAGAGGGACTATTGGCGTT	480
481	TAGCCAATGGAAGTGTGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGC	540
541	ACGCGCGCTACACTGATGCATTCAACGAGCCTAGCCTTGACCGAGAGGTCCGGGTAATCT	600
601	TTGAAACTGCATCGTGATGGGGCTAGATTATTGCAATTATTAATCTTCAACGAGGAATGC	660
661	CTAGTAAGCGTGATTCATCAGATCG	685

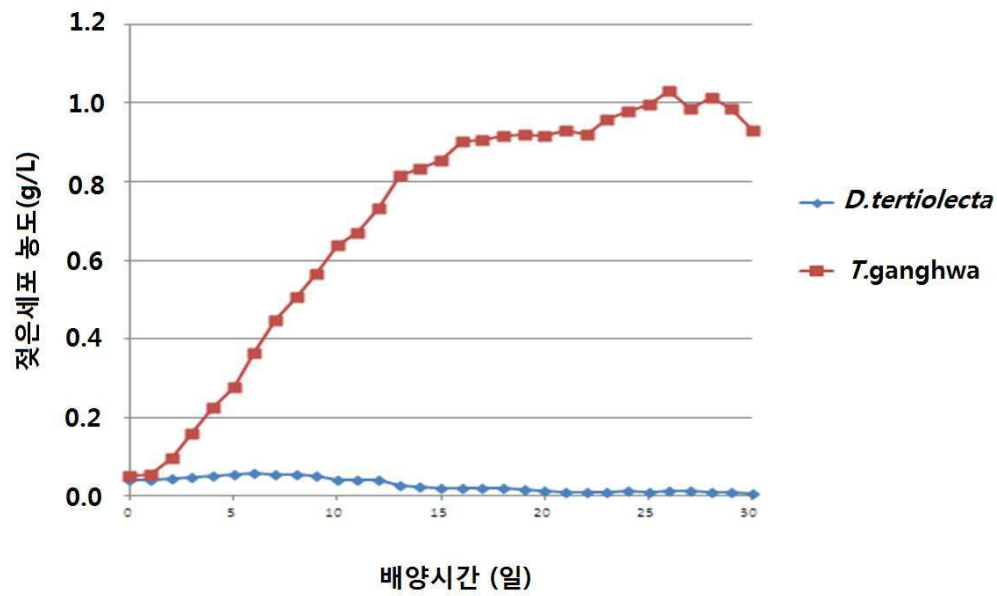
도면3a



도면3b



도면4a



도면4b



서열 목록

- <110> INHA Industry Partnership Institute
- <120> A novel Tetraselmis sp and method for preparing biodiesel with this strain
- <130> PD12-0485

<160> 3

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 685

<212> DNA

<213> Tetraselmis sp. Ganghwa

<400> 1

tgaaagacga acttctgcga aagcatttgt caaggatgtt ttcattaatc aagaacgaaa 60

gttgggggct cgaagacgat tagataccgt cctagtctca accataaacg atgccgacta 120

gggattggca gacgtttttt tgatgactct gccagcacct tatgagaaat caaagttttt 180

gggttccggg gggagtatgg tcgcaaggct gaaacttaaa ggaattgacg gaagggcacc 240

accaggcgtg gagcctgcgg cttaatttga ctcaacacgg gaaaacttac caggtccaga 300

catagtgagg attgacagat tgagagctct ttcttgattc tatgggtggt ggtgcatggc 360

cgttcttagt tggtaggttg ccttgcagg ttgattccgg taacgaacga gacctcagcc 420

tgctaaatag ttactcctac tttggttagga ggtgaacttc ttagaggac tattggcggt 480

tagccaatgg aagtgtgagg caataacagg tctgtgatgc ccttagatgt tctgggccgc 540

acgcgcgcta cactgatgca ttcaacgagc ctacgcttga ccgagaggtc cgggtaatct 600

ttgaaactgc atcgtgatgg ggctagatta ttgcaattat taatcttcaa cgaggaatgc 660

ctagtaagcg tgattcatca gatcg 685

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR forward primer

<400> 2

gtcagagggtg aaattcttgg attta 25

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR reward primer

<400> 3

agggcaggga cgtaatcaac g 21