(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0125576
(43) 공개일자 2011년11월21일

(51) Int. Cl.
C12N 1/12 (2006.01) *C12P 7/64* (2006.01)
C12R 1/89 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0109292
(22) 출원일자 2010년11월04일
심사청구일자 없음
(30) 우선권주장
1020100044855 2010년05월13일 대한민국(KR)

(71) 출원인
한국생명공학연구원
대전 유성구 어은동 52번지
충남대학교산학협력단
대전 유성구 궁동 220 충남대학교
한국해양연구원
경기 안산시 상록구 사동 1270번지
(72) 발명자
정원중
대전광역시 유성구 어은동 52번지 한국생명공학연구원
박연일
대전광역시 유성구 지족동 열매마을 아파트 705동 401호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
최규환

전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 북극 해양에서 분리한 지질 고생산 미세조류 클라미도모나스 세포주 및 이의 용도

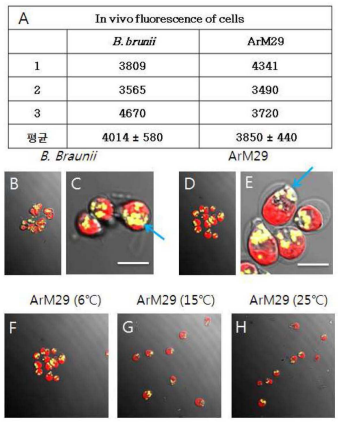
(57) 요 약

본 발명은 기능성 지질을 고농도로 축적하는 신규 미세조류 클라미도모나스(*Chlamydomonas*)에 관한 것이다.

본 발명에 따른 세포주 ArM29는 북극에서 발견된 신규 클라미도모나스로서 기존에 알려진 클라미도모나스 중 가장 높은 지질 축적을 보이며, 대표적인 지질 고축적 미세조류인 보트리오코쿠스 브라우니(*Botryococcus brauni i*)와 비슷한 정도의 지질을 축적한다. 또한 ArM29는 저온(6℃)에서도 실온(25℃) 조건에서와 동일한 정도로 지질을 고농도로 축적하는 세포주이다.

구체적으로는 극지(북극, 남극)의 바다 및 민물에서 자라는 클라미도모나스들을 GC 분석법 및 nile red 염색법으로 지방산 조성 및 지질의 축적형태를 조사하고, fluorome 분석 방법으로 광합성 특성을 분석하여, lipid body 형태로 지질을 고농도로 축적하는 세포주를 선발하고, 배양 온도에 따른 지질 축적 정도를 조사하여 ArM29 세포주를 선발하였다.

대 표 도 - 도6



(72) 발명자

최한구

서울특별시 양천구 목5동 902번지 목동아파트 218동 206호

강성호

서울특별시 마포구 서교동 328-18번지 우림빌딩 401호

김석원

대전광역시 유성구 어은동 52번지 한국생명공학연구원

손수현

대전광역시 유성구 어은동 52번지 한국생명공학연구원

유장렬

대전광역시 유성구 어은동 52번지 한국생명공학연구원

특허청구의 범위

청구항 1

북극 해양 유래 지질 고생산 미세조류인 클라미도모나스 (*Chlamydomonas* sp.) 세포주.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 세포주는 클라미도모나스 ArM29 (*Chlamydomonas* sp. ArM29) 세포주(KCTC 11695BP)인 것을 특징으로 하는 세포주.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 세포주는 지질체(lipid body) 형태로 지질을 고농도로 축적하는 것을 특징으로 하는 세포주.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 세포주는 다양한 배양 온도에서 지질을 고농도로 축적하는 것을 특징으로 하는 세포주.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 배양 온도는 0℃ 내지 30℃인 것을 특징으로 하는 세포주.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 세포주는 주요 지방산으로서 탄소수가 16이며 이중결합수가 0인 지방산 및 탄소수가 18이며 이중결합수가 1인 지방산을 포함하는 지질을 생산하는 것을 특징으로 하는 세포주.

청구항 7

제1항의 세포주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 지질 제조용 미생물 제제.

청구항 8

제1항의 세포주를 배양하고, 그 배양액으로부터 지질을 분리하는 것을 특징으로 하는 지질의 제조 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 세포주의 배양은 0℃ 내지 30℃의 온도에서 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제8항의 방법에 의해 제조되며, 주요 지방산으로서 탄소수가 16이며 이중결합수가 0인 지방산 및 탄소수가 18이며 이중결합수가 1인 지방산을 포함하는 지질.

청구항 11

제1항의 세포주를 배양하는 단계;

상기 배양액으로부터 지질을 분리하는 단계; 및

상기 지질을 트랜스에스테르화시켜 지방산 에스테르 및 글리세롤을 생성하는 단계를 포함하는 바이오디젤의 제조 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 지방산 에스테르는 메틸 에스테르 또는 에틸 에스테르인 것을 특징으로 하는 바이오디젤의 제조 방법.

청구항 13

제1항의 세포주를 배양하는 단계;

상기 배양액으로부터 지질을 분리하는 단계; 및

상기 지질을 트랜스에스테르화시켜 지방산 에스테르 및 글리세롤을 생성하는 단계를 포함하는 글리세롤의 제조 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 기능성 지질을 고농도로 축적하는 미세조류 클라미도모나스 세포주 및 이의 용도에 관한 것으로, 상세하게는 바이오디젤, 기능성 지질 생산에 사용할 수 있는 미세조류 클라미도모나스 세포주에 관한 것이다. 극지에서 자라는 클라미도모나스들을 대상으로 GC 분석법과 nile red 염색법으로 고농도 지질을 축적하는 클라미도모나스 세포주를 선발하고, flurome 분석방법으로 색소 및 광합성 특성을 분석하고, in vivo 형광법으로 상대적 지질함량을 측정하고, 저온에서부터 실온까지 배양 중에 고농도로 지질을 축적하는 미세조류 클라미도모나스 세포주 ArM29에 대한 것이다.

배 경 기 술

[0002] **바이오에너지**

[0003] 최근 전 세계적으로 화석에너지 자원위기 및 지구온난화에 직면하였으며, 선진국을 중심으로 환경 친화적인 바이오, 수소, 태양 등의 신·재생에너지 확산을 위한 정책 입안과 함께 이들 신·재생에너지의 공급과 사용을 촉진하고 있다.

[0004] 국내에서도 최근 신·재생에너지 개발에 적극 나서고 있지만 아직까지는 시작 단계이다.

[0005] 바이오에너지는 화석에너지와는 달리 이산화탄소를 발생시키지 않는 친환경적 에너지로서, 이산화탄소와 태양에너지를 포획하는 광합성 과정을 통하여 에너지가 축적된 유기 탄소 화합물이 생성되고 이렇게 해서 저장된 바이오매스로부터 에너지로 추출하는 것이다.

[0006] 바이오에너지는 재생가능하며 유해성분이 거의 없는 비독성 에너지이고, 미생물에 의해 완전히 분해되며 이산화탄소를 고정해서 생산되므로 온실효과를 감소시킨다.

[0007] 현재 육상자원을 이용한 바이오에너지 연구가 진행되었으나, 식량자원 및 식량 재배면적과 경쟁 등 육상자원 이용의 한계점이 드러나면서 해양자원(미세조류 및 해조류)을 이용하고자 하는 정책과 연구들이 전 세계적으로 시작되고 있다.

[0008] 바이오에너지는 대표적으로 바이오에탄올/부탄올과 바이오디젤이 있는데, 거대조류(macroalgae)를 중심으로 바이오에탄올/부탄올 생산 연구가 진행되고 있으며, 미세조류(microalgae)를 중심으로 바이오디젤 연구가 진행되고 있다.

[0009] **바이오디젤**

[0010] 바이오디젤은 바이오매스에 포함된 지방산(fatty acid)의 트랜스에스테르화(transesterification) 과정에 의해 메틸 에스터 또는 에틸 에스터 형태로 생산되며 부산물로 글리세롤이 생성된다.

[0011] 150℃의 인화점을 가진 바이오디젤은 경유(64℃)에 비해 불이 잘 붙지 않고, 더구나 폭발하기 쉬운 휘발유(-45℃)보다는 안정적이어서, 미국 산업안전보건청(OSHA)이 비가연성 액체로 분류하고 있다. 아주 고온에서는 불이 붙지만 바이오디젤을 에너지로 쓰는 차량은 사고에 더 안전하다.

[0012] 경유와는 달리 바이오 디젤은 에너지로서 연소될 때 발암물질 및 돌연변이를 일으키는 가스 방출량이 적으며 기타 배출물이 현저하게 낮은 비독성 에너지이다.

[0013] **미세조류 바이오디젤**

[0014] 미세조류의 태양에너지 이용 효율은 5%로, 육상식물의 0.2%에 비해 약 25배 정도 높으며, 이산화탄소 고정화 속

도는 소나무의 15배로 매우 효율적이다.

[0015] 현재 미세조류는 사료나 생물학적 비료로 이용될 뿐 아니라, *Spirulina*, *Chlorella*, *Dunaliella*, *Nostoc*, *Aphanizomenon* 등을 이용한 건강식품으로 이용되고 있다.

[0016] 미세조류는 현미경적 크기로 육상식물과 비슷한 광합성 메커니즘을 가지지만, 물과 이산화탄소와 다른 여러 영양분의 접근이 효율적인 수중환경에서 서식하므로 태양에너지를 바이오매스로 전환함에 있어서 더욱 효과적이다.

[0017] 미국 NREL에서는 1978년에서 1996년까지 미세조류를 이용한 바이오디젤 연구 (Aquatic Species Program)를 수행 중에 경제성 문제로 중단하였으나, 최근 화석에너지 값의 급등, 지구온난화 등 때문에 다시 연구 개발을 수행 중에 있다.

[0018] 2007년 12월에는 세계적 정유회사인 Shell사와 HR Biopetroleum이 공동으로 바이오디젤 생산을 목적으로 미세조류 배양 시설을 하와이에 설치하였으며, 2008년 1월에는 미국의 Solazyme사가 Soladiesel이라고 하는 시제품을 Mercedes-Benz의 디젤자동차에 제공하여 성능을 시험하기로 하였다고 발표하였고, Chevron사는 Solazyme사와 협약을 맺고 공동 기술 개발을 하기로 하였다.

[0019] 최근 프랑스에서는 3년간 280만 유로의 예산을 Shamash 프로그램에 배정하여 해조류 활용에 대한 활발한 연구를 추진 중이며, Shamash 프로그램은 국립연구청이 실현 가능한 생산모델의 개발을 위해서 프랑스 대학의 7개 연구팀을 구성하여 미세조류에서 나온 지방산의 생산과 함께 이를 바이오에너지로 변형하는 연구를 수행 중에 있다.

[0020] 국내에서도 중소업체를 중심으로 바이오디젤 생산 공정 기술 개발, 바이오디젤 에너지의 발굴 등의 연구를 하고 있으며, 현재 해조류를 이용한 바이오디젤 생산에 대한 연구를 진행 중에 있다.

[0021] 지질을 생산하는 미생물 (heterotrophic microorganisms)를 이용하는 연구가 수행되고 있으나, sugar 등의 탄소원을 첨가해야하는 반면, 광합성 미세조류는 탄소원으로 이산화탄소를 이용하므로 훨씬 경제적이며 효율적이다. 미세조류에서는 식물 지질보다 에이커(acre) 당 100-300배 이상의 지질이 생산될 수 있다.

[0022] **고지질 함유 미세조류 연구**

[0023] 현재, 항산화물질, 식품 첨가물 사료 등으로 사용될 수 있는 미세조류(*Dunalliela, Haematococcus*, *Spirilluna* 등)의 대량 배양 및 이용 기술이 개발되어 있으므로 바이오디젤용 미세조류 대량배양에 적용이 가능하다.

[0024] 높은 지질 함량 때문에 바이오디젤 생산에 있어서 가장 주목받아 온 미세조류 (*Botryococcus, Schiochytrium* 등)의 경우, 주로 지질 함량을 높이기 위한 최적의 배양 조건을 찾는데 연구개발이 집중되고 있다.

[0025] 또한 지질을 높은 농도로 축적하는 미세조류의 경우 전형적으로 세포 내에 lipid body를 축적한다. 지금까지의 연구 결과에 의하면, 종에 따라 지질의 최적 생산조건에는 많은 차이가 있으며, 일반적으로는 23℃ 정도의 수온에서, 질소원 공급에 제한을 주고, 이산화탄소의 농도를 높여 주는 것이 지질의 합성을 증가시켜 주는 것으로 밝혀져 있다.

[0026] **클라미도모나스 연구**

[0027] 클라미도모나스(*Chlamydomonas*)는 단세포 녹조류(Chlorophyta)로서 민물, 해양, 눈, 극지 등 다양한 환경에 분포하는 진핵생물이며, 클라미도모나스는 6-8 시간의 doubling time을 가지는 미세조류로서 3-5일의 doubling time을 가지는 50% 이상의 지질 고함유 미세조류보다 증식속도가 10배 이상 빠르다.

[0028] 클라미도모나스는 생리, 생화학, 분자생물학, 유전체 연구(genome project 완성되었음)가 가장 앞서 있어서 유전자 재조합이 쉽게 가능한 미세조류로서 녹색효모(Green yeast)라 불린다.

[0029] 일반적으로 중온성 클라미도모나스(*Chlamydomonas reinhardtii*)는 지질 함량이 21%로서 비교적 높지 않으나, *Chlamydomonas* sp. MCCS 026의 경우 지질 함량이 25% 이상으로 바이오디젤 생산용으로 주목받고 있다.

[0030] 현재까지 미세조류를 이용한 바이오디젤 연구의 대부분이 지질생산을 많이 할 수 있는 종의 선발 및 지질 생산 조건에 집중되어 있었다. 그러나 지질을 고농도로 축적하는 미세조류는 일부에 한정되어 있으며, 최적의 온도

및 특정 배양 조건에서 지질을 축적하는 것이 일반적이다. 따라서 다양한 온도에서 자라면서 고농도로 지질을 축적하고, 그대로 바이오디젤 및 기능성 지질생산의 소재로 사용될 수 있고, 지질 분리가 간단하면서도 비용이 적게 드는 분자육종적 개량이 가능한 미세조류의 개발이 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0031] 본 발명은 다양한 온도조건에서 생장가능하면서 고농도로 지질을 지질체(lipid body) 형태로 축적하여 추출 및 추출 후 공정을 최소화할 수 있는, 현재 상태로의 바이오디젤 및 기능성 지질생산의 소재를 제공하는데 그 목적이 있다.

[0032] 따라서, 본 발명자들은 지질함량이 높아서 고급 지방산 생산 및 바이오에너지용으로 개발가능한 미세조류를 선발하기 위하여, 극지 미세조류 중 클라미도모나스 세포주들을 GC 분석법, 나일 레드(nile red) 염색법, 플루오롬(fluorome) 분석법으로 스크리닝하여, 다양한 온도조건에서 고농도의 지질을 축적하며 잘 자라는 클라미도모나스 세포주 ArM29를 선발함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0033] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 북극 해양 유래 지질 고생산 미세조류인 클라미도모나스 ArM29 (*Chlamydomonas* sp. ArM29) 세포주를 제공한다.

[0034] 또한, 본 발명은 상기 세포주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 지질 제조용 미생물 제제를 제공한다.

[0035] 또한, 본 발명은 상기 세포주를 배양하고, 그 배양액으로부터 지질을 분리하는 것을 특징으로 하는 지질의 제조방법 및 상기 방법에 의해 제조된 지질을 제공한다.

[0036] 또한, 본 발명은 상기 세포주를 배양하는 단계, 상기 배양액으로부터 지질을 분리하는 단계 및 상기 지질을 트랜스에스테르화시켜 지방산 에스테르 및 글리세롤을 생성하는 단계를 포함하는 바이오디젤의 제조 방법을 제공한다.

[0037] 또한, 본 발명은 상기 세포주를 배양하는 단계, 상기 배양액으로부터 지질을 분리하는 단계 및 상기 지질을 트랜스에스테르화시켜 지방산 에스테르 및 글리세롤을 생성하는 단계를 포함하는 글리세롤의 제조 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0038] 기존의 클라미도모나스는 영양소 결핍 조건에서 지질체(lipid body)를 축적하는 것으로 알려져 있다. 그러나 본 발명의 세포주 ArM29가 배양 중에 고농도로 지질을 축적하는 세포주로 확인되었으며, ArM29는 지금까지 발견된 클라미도모나스에서 가장 높은 지질함량을 가지는 것으로 생각된다.

[0039] 본 발명에 따른 클라미도모나스 ArM29는 다양한 온도조건에서 배양이 가능하며, 세포 내 중성기름 방울을 특이적으로 염색할 수 있는 나일 레드(nile red) 분석법으로 고농도의 지질을 축적하는 것을 확인함으로써, 바이오디젤 및 기능성 지질생산의 소재로 사용될 수 있다.

[0040] 또한 클라미도모나스이므로 다른 미세조류와는 달리 분자육종적 개량이 가능하다. 또한 본 세포주 ArM29는 배양 중에 지질을 고농도로 축적하므로 바이오디젤용 미세조류로 적당하고, 결빙온도 이상에서는 모두 잘 자라므로 배양시 온도 조건을 특별히 맞출 필요가 없고, 봄 여름 가을 겨울 모두 잘 자라므로 연중 배양 및 생산이 경제적으로 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0041] 도 1은 클라미도모나스 세포주의 GC(기체 크로마토그래피) 분석에 의한 지방산 프로파일을 조사한 것이다.

도 2는 ArM29를 포함한 클라미도모나스의 나일 레드(nile red) 염색법에 의한 지질체(lipid body) 형성을 비교한 사진이다.

도 3은 실온 엽록소 형광분석법으로 광계2의 효율(A), 정류상태에서 광합성 전자전달 효율(B), 전저전달계 PQ의 환원상태(C), 및 비광화학적 소산(D)을 측정한 결과이다. Fv/Fm: 광계2의 최대효율(Intrinsic PSII

efficiency), 1-F/Fm': 광계2의 실제효율(actual PSII efficiency), qP: 플라스토퀴논 산화상태(extent of PQ reduced), NPQ: 광계2에서 흡수된 빛 에너지의 비광화학적 소산(non-radiative dissipation of absorbed light by PSII), Co: 25℃에서 배양된 CC124, CC: 6℃에서 배양된 CC124, 22: 6℃에서 배양된 ArM22; 29: 6℃에서 배양된 ArM29, 6: 6℃에서 배양된 ArF6, 24: 6℃에서 배양된 ArF24, 28: 6℃에서 배양된 ArF28, 48: 6℃에서 배양된 AnF48.

도 4는 클라미도모나스 세포주를 100% 메탄올로 광합성 색소를 추출한 후 Sinco PDA 형 분광형광계(spectrofluorometer)를 이용하여 흡수스펙트럼을 측정한 결과이다.

도 5는 77K에서 440nm로 엽록소를 여기(excitation)시킨 후 600에서 800nm까지 방출(emission)되는 형광을 측정한 그림이다. 열린 화살표(Open arrow): PSI 유래 피크(708 내지 715 nm), 닫힌 화살표(closed arrow): PSII 유래 피크 (685 nm).

도 6은 대표적으로 높은 지질 축적을 보이는 미세조류인 보트리오코쿠스 브라우니(Botryococcus braunii)와 ArM29의 지질 함량을 생체내(in vivo) 형광법 및 공초점 현미경으로 분석하고, 배양온도에 따른 지질 축적의 차이를 비교한 것이다.

A: 생체내 형광 값, B: 보트리오코쿠스 브라우니의 지질체 축적, C: 보트리오코쿠스 브라우니의 지질체의 확대 사진, D: ArM29의 지질체 축적, E: ArM29 지질체의 확대 사진, F 내지 H: 배양온도(6℃, 15℃ 및 25℃)에 따른 지질체 축적 사진. 화살표: 세포 내 축적된 지질체, 스케일 바(scale bar) = 10 μm.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0042] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 북극 해양 유래 지질 고생산 미세조류인 클라미도모나스 ArM29 (*Chlamydomonas* sp. ArM29) 세포주를 제공한다. 상기 세포주는 바람직하게는 클라미도모나스 ArM29 (*Chlamydomonas* sp. ArM29) 세포주(KCTC 11695BP)이다.

[0043] 상기 클라미도모나스 ArM29 세포주는 북극해의 해빙으로부터 시료를 수집하고, 아가(agar) 배지 상에 도말하여 형성된 단일 콜로니를 선발하여, 18S rDNA 및 rbcL 유전자 서열분석을 통하여 동정 되었으며, 나일 레드(Nile red) 염색법 및 생체내(in vivo) 형광분석법을 통해 지질 고생산 클라미도모나스 ArM29 세포주를 확인하였다. 상기 지질 고생산 클라미도모나스 세포주를 한국생명공학연구원(KCTC)에 2010년 5월 10일자로 기탁하였다 (기탁번호: KCTC 11695BP).

[0044] 상기 세포주는 지질체(lipid body) 형태로 지질을 고농도로 축적하는 것을 특징으로 한다. 또한, 상기 세포주는 다양한 배양 온도에서 지질을 고농도로 축적할 수 있으며, 바람직하게는 상기 배양 온도는 0℃ 내지 30℃일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 또한, 상기 세포주는 주요 지방산으로서 탄소수가 16이며 이중결합수가 0인 지방산(16:0 지방산) 및 탄소수가 18이며 이중결합수가 1인 지방산(18:1 지방산)을 포함하는 지질을 생산하는 것을 특징으로 한다.

[0045] 본 발명은 또한, 상기 세포주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 지질 제조용 미생물 제제를 제공한다. 상기 미생물 제제는 클라미도모나스 ArM29 세포주를 유효성분으로 포함할 수 있으며, 바이오오일의 대량 생산에 효과적으로 이용될 수 있다. 상기 대량 생산된 바이오오일은 트랜스에스테르화 과정을 통해 바이오디젤을 생산하는데 이용될 수 있다.

[0046] 본 발명은 또한, 상기 세포주를 배양하고, 그 배양액으로부터 지질을 분리하는 것을 특징으로 하는 지질의 제조 방법을 제공한다. 상기 세포주는 다양한 배양 온도에서 지질을 고농도로 축적할 수 있으며, 상기 배양 온도는 바람직하게는 0℃ 내지 30℃일 수 있다. 세포주 배양액으로부터 지질을 분리하는 방법은 당업계에 공지된 임의의 방법을 이용할 수 있다. 본 발명의 세포주는 지질체 형태로 고농도로 지질을 축적하므로, 추출 및 추출 후 공정을 최소화할 수 있는 장점이 있다.

[0047] 본 발명은 또한, 상기 지질의 제조 방법에 의해 제조된 지질을 제공한다. 제조된 지질은 주요 지방산으로서 탄소수가 16이며 이중결합수가 0인 지방산(16:0 지방산) 및 탄소수가 18이며 이중결합수가 1인 지방산(18:1 지방산)을 포함할 수 있다.

[0048] 본 발명은 또한, 상기 세포주를 배양하는 단계;

[0049] 상기 배양액으로부터 지질을 분리하는 단계; 및

[0050] 상기 지질을 트랜스에스테르화시켜 지방산 에스테르 및 글리세롤을 생성하는 단계를 포함하는 바이오디젤의 제

조 방법을 제공한다.

[0051] 본 발명의 방법에서, 세포주의 배양은 바람직하게는 0℃ 내지 30℃의 온도에서 수행할 수 있다. 세포주 배양 배지는 당업계에서 일반적으로 통용되는 배지를 이용할 수 있다. 상기 지방산 에스테르는 바람직하게는, 메틸 에스테르 또는 에틸 에스테르일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 상기 바이오디젤은 바이오매스에 포함된 지방산의 트랜스에스테르화 과정에 의해 메틸 에스테르 또는 에틸 에스테르 형태로 생산될 수 있으며, 상기 트랜스에스테르화 과정의 부산물로 글리세롤이 생성될 수 있다.

[0052] 상기 트랜스에스테르화 과정은 바이오매스에 포함된 지방의 크고 가지를 낸 분자 구조를 정규 디젤 엔진이 요구하는 작고 직선 사슬의 분자로 변형시키는 방법을 말한다. 상기 트랜스에스테르화 과정의 유화제로서 Triton X-100 또는 Tween 60 등을 첨가할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 상기 유화제는 바이오오일의 계면 안정을 도모하고 잘 혼합되도록 하여 반응 수율을 높여서 바이오디젤의 회수 비용을 절약할 수 있게 한다. 또한, 상기 트랜스에스테르화 과정의 반응 촉매제로서 수산화나트륨 또는 수산화칼륨을 사용할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0053] 상기 바이오디젤은 바이오연료로서 하기의 장점을 가질 수 있다; (1) 바이오연료는 일반적인 바이오매스 자원으로부터 손쉽게 얻을 수 있다. (2) 바이오연료는 연소에 있어서 이산화탄소의 순환을 나타낸다. (3) 바이오연료는 환경 친화적인 잠재력을 갖는다. (4) 바이오연료를 사용함으로써 환경, 경제 및 소비자에게 많은 이익을 준다. (5) 바이오연료는 미생물에 의해 무해한 물질로 분해될 수 있고, 지속가능성에 기여한다.

[0054] 본 발명은 또한, 상기 세포주를 배양하는 단계;

[0055] 상기 배양액으로부터 지질을 분리하는 단계; 및

[0056] 상기 지질을 트랜스에스테르화시켜 지방산 에스테르 및 글리세롤을 생성하는 단계를 포함하는 글리세롤의 제조 방법을 제공한다.

[0057] 본 발명의 방법에서, 세포주의 배양 온도 및 배지 및 지질 분리 방법은 전술한 바와 같다.

[0058] 상기 글리세롤은 윤활제, 연고나 좌약과 같은 약품의 제조, 관장제, 식품이나 화장품의 건조방지제 또는 정미제, 부동액, 냉각제, 도료, 안료, 인쇄 잉크, 투명비누의 제조, 실험실의 분석 시약, 용제, 셀로판, 접착제, 알키드 수지 또는 다이나마이트 등의 제조에 이용될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0059] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0060] **실시예 1: 클라미도모나스 ArM29의 분리 및 동정**

[0061] 클라미도모나스 ArM29 (*Chlamydomonas* sp. ArM29)는 2008년 4월 북극해의 해빙(sea ice) 상에서 빙심(ice core)을 뚫어 채취한 원통형 얼음으로부터 생물시료를 분리 및 냉장조건으로 한국해양연구원 부설 극지연구소로 운반한 후, 극지저온배양실험실에서 아가(agar) 배지 상에 도말하여 형성된 단일 콜로니를 선발하여, 18S rDNA 및 rbcL 유전자 서열분석을 통하여 *Chlamydomonas* sp.로 동정된 클라미도모나스 세포주이다.

[0062] **실시예 2: GC 분석에 의한 지방산 조성 분석**

[0063] 지방산 분석은 Miller(1985)의 방법을 변형한 Yin 등(2008, Biotechnology and Bioprocess Engineering 13(6): 778-784)의 방법으로 GC (기체 크로마토그래피)를 이용하여 분석하였다. 배양된 세포를 동결건조한 후, 비누화(saponification) 용액(15% NaOH in 50% MeOH)에 현탁하여 100℃에서 30분간 가열하였다. ME(메틸 에스테르) 분석을 위하여 메탄올 HCl (6N HCl-MeOH)을 첨가 후 80℃에서 10분간 가열하여 준비하였다.

[0064] 지방산 분석 결과, ArM29를 포함하는 클라미도모나스 세포주들은 중온성 클라미도모나스(*Chlamydomonas reinhardtii*, cc-124)와 유사하게 16:0과 18:1 지방산이 대부분을 차지하는 것으로 나타났다. ArM29는 특징적으로 18:1의 지방산 비율이 상대적으로 낮았으나, 다른 세포주에 비해서 절대량은 높았다 (도 1).

[0065] **실시예 3: 나일 레드(Nile red) 염색법에 의한 고지질 축적 클라미도모나스 세포주 선발**

[0066] OD 0.5까지 배양된 클라미도모나스 세포 현탁액 100 ㎕에 4 ㎕의 나일 레드(Sigma) 용액 (0.1 mg/mL 아세톤)을 첨가하고 30분 후에 공초점 현미경(LSM510 META, Zeiss)으로 여기(excitation)는 488 nm 및 633 nm에서, 방출(emision)은 530 내지 600 nm에서 나일 레드 형광과 엽록소 형광을 관찰하였다. 그 결과 색소체는 붉은 색으로 나타났으며, ArM29에서는 동시에 노란색의 지질체(lipid body) (화살표, 세포 내 노란 구형 입자)가 관찰되었다. 이는 ArM29가 다른 클라미도모나스와는 달리 배양 중에 지질체 형태로 지질을 고농도로 축적하는 것을 나타낸다 (도 2). 그러나 대조구 중온성 클라미도모나스(*C. reinhardtii*, cc-124)와 다른 세포주들은 배양 중에 거의 지질체를 형성하지 않았다.

[0067] **실시예 4: 플루오롬(Fluorome) 분석법에 의한 클라미도모나스 세포주들의 광합성 특성**

[0068] 플루오롬(Fluorome) 분석법으로 광합성 특성을 조사한 결과, ArM29 라인은 저온에서도 높은 광계2 효율을 보여서 저온 저항성을 보였으나, 정류상태에서는 빛 에너지가 광화학 반응보다는 비광화학적 방법으로 소산됨으로 인해서 광합성율이 비교적 낮았다. 즉, ArM29의 경우 광계2 효율은 저온 스트레스하에 있는 중온 클라미도나스보다는 높지만 비흡수된 빛 에너지가 주로 비광화학적인 방법으로 소산됨으로 인해서 정류상태에서의 광합성 전자전달능이 중온 클라미도모나스 혹은 ArF6에 비해서 약 50% 정도를 보였다(도 3).

[0069] 100% 메탄올로 광합성 색소를 추출하여 흡수스펙트럼을 조사한 결과, ArM22와 AnF48에서 카로티노이드가 상대적으로 높음을 알 수 있으나 ArM29의 경우 엽록소와 카로티노이드 함량은 중온성 클라미도모나스와 큰 차이를 보이지 않았다(도 4).

[0070] 광합성기구의 광계2와 광계1의 함량을 77K 엽록소 형광으로 측정한 결과, ArM29 라인의 경우 광계1의 함량이 현저하게 감소한 특성을 보였다(도 5).

[0071] 중온성 클라미도모나스가 저온 스트레스를 받게 되면 광계1에서 방출되는 피크 (~710nm)가 현저하게 감소함으로써 광계2 (피크 685nm)보다 저온에 민감하게 억제됨을 알 수 있다. ArM29의 경우 저온 스트레스를 받고 있는 중온성 클라미도모나스처럼 광계1이 현저하게 감소하였는데 이는 클라미도모나스가 저온에 적응하는 일반적인 현상인 것으로 추정된다. 반면에 담수 클라미도모나스 라인들은 중온 클라미도모나스와 유사한 광계2/광계1 비율을 보여주고 있다 (도 3, 4 및 5).

[0072] **실시예 5: 생체내(In vivo) 형광분석법에 의한 ArM29 세포주의 상대적 지질함량 분석**

[0073] Lee 등 (1998, Biotechnology Techniques 12(7): 553-556)의 방법으로 지질함량을 분석하였다. OD 0.5의 ArM29와 보트리오코쿠스 브라우니 UTEX 572 세포주들을 나일 레드로 염색한 후, 나일 레드 무처리구와 비교하여 생체내 형광 양을 형광계(fluorometer) (Tuner model 450)로 3회 반복 측정하였다. 490 nm의 여기 필터(excitation filter)와 585 nm의 방출 필터(emission filter)를 사용하여 형광을 측정하였다.

[0074] 생체내 형광(In vivo flurorescence) 방법으로 상대적 지질함량을 조사한 결과, ArM29번은 상대적 값이 3850±440으로 대표적인 지질 고축적 세포주인 보트리오코쿠스 브라우니 UTEX 572의 4014±580과 비교하여 유사한 정도의 지질함량을 나타냈다(도 6A 내지 6E).

[0075] **실시예 6: 배양 온도에 따른 ArM29 세포주의 지질 축적 분석**

[0076] ArM29 세포주를 6℃, 15℃ 및 25℃에서 배양하면서 세포주의 지질 축적을 나일 레드 염색법으로 비교 조사하였다. 그 결과 배양 온도변화에 따른 지질축적의 차이가 나타내지 않았다. 이는 ArM29는 저온에서 실온까지 다양한 온도에서 배양 중에 고농도로 지질을 축적하고 있음을 나타낸다(도 6F 내지 6H).

수탁번호

[0077]

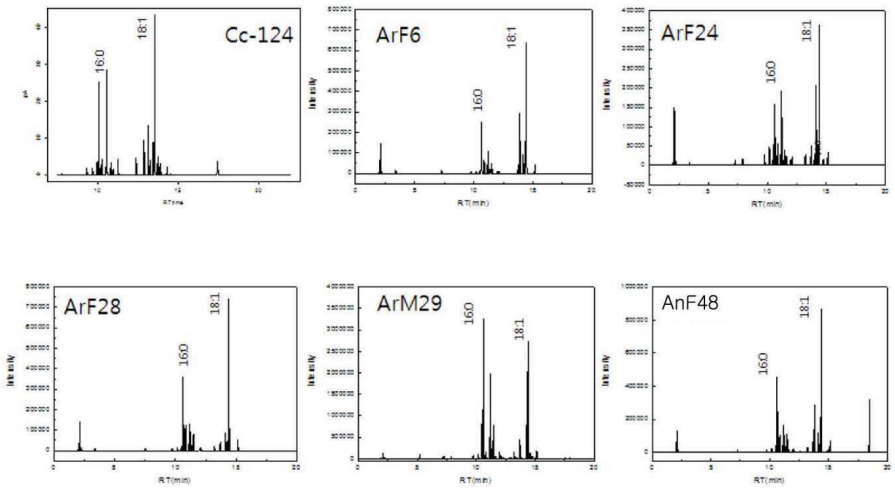
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC11695

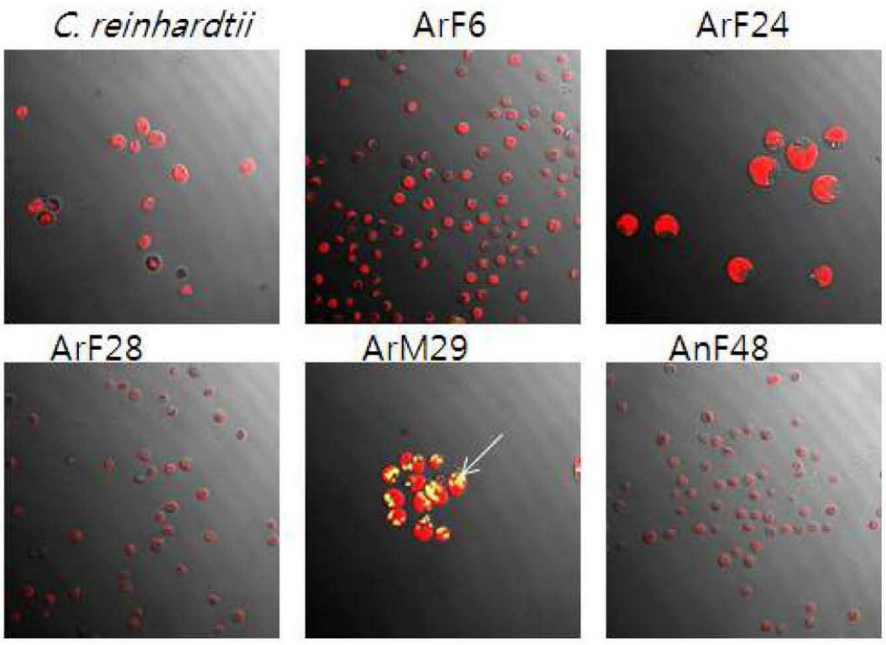
수탁일자 : 20100510

도면

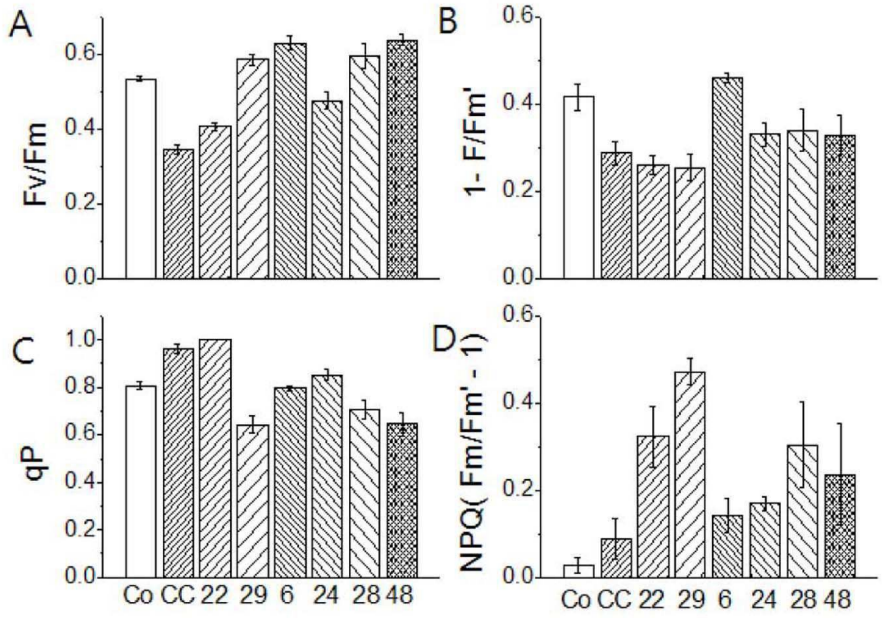
도면1



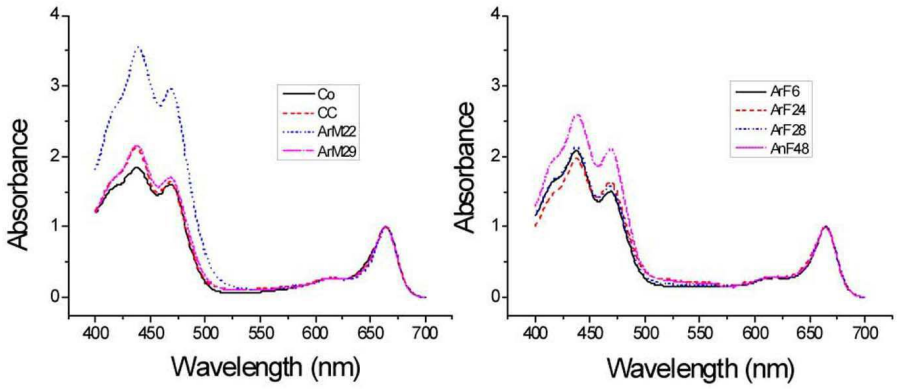
도면2



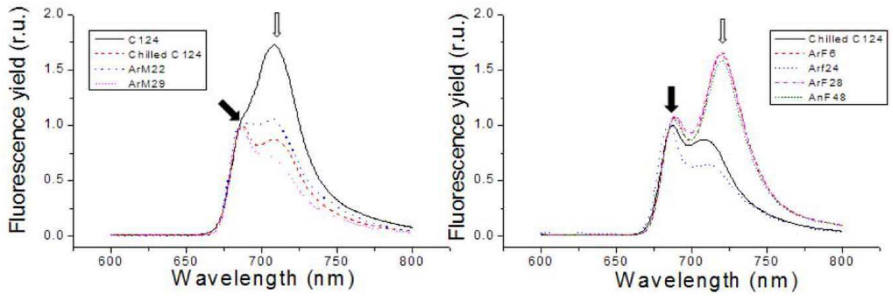
도면3


A
Fv/Fm
B
1- F/Fm'
C
qP
D
NPQ(Fm/Fm' - 1)
Co CC 22 29 6 24 28 48

도면4


Absorbance
Wavelength (nm)
Co
CC
ArM22
ArM29
ArF6
ArF24
ArF28
AnF48

도면5


Fluorescence yield (r.u.)
Wavelength (nm)
C124
Chilled C124
ArM22
ArM29
Chilled C124
ArF6
Arf24
ArF28
AnF48

도면6

A	In vivo fluorescence of cells	
	B. brunii	ArM29
1	3809	4341
2	3565	3490
3	4670	3720
평균	4014 ± 580	3850 ± 440

