



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0090385
(43) 공개일자 2014년07월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/12 (2006.01) C12P 7/64 (2006.01)
C10L 1/04 (2006.01) C10G 3/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0002313
(22) 출원일자 2013년01월09일
심사청구일자 2013년12월09일

(71) 출원인
한국생명공학연구원
대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
한국해양과학기술원
경기도 안산시 상록구 해안로 787 (사동)
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
정원중
대전광역시 유성구 과학로 125
안준우
대전광역시 유성구 과학로 125
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
최규환

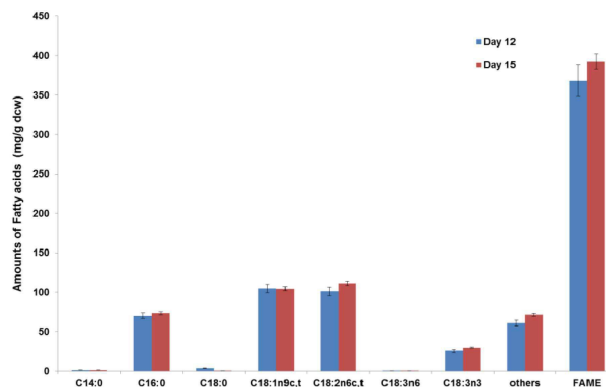
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 북극 해양에서 분리한 전분 및 지질 고생산 미세조류 클로렐라 세포주 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 기능성 전분 및 지질을 고농도로 축적하는 신규 미세조류 클로렐라(*Chlorella* sp.)에 관한 것으로, 본 발명에 따른 클로렐라 ArM29B 세포주는 배양 중에 고농도로 전분 및 지질을 축적하는 세포주로 확인되었으며, 다양한 온도조건에서 배양이 가능하며, 세포 내 중성지방 방울을 특이적으로 염색할 수 있는 나일 레드(nile red) 분석법으로 고농도의 지질을 축적하는 것을 확인함으로써, 바이오디젤 및 기능성 지질생산의 소재로 사용될 수 있다. 또한 본 세포주 클로렐라 ArM29B 세포주는 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 가능하다.

대 표 도 - 도5



(72) 발명자

유장렬

대전광역시 유성구 과학로 125

최한구

서울특별시 양천구 목동서로 70 목동2단지아파트
218동 206호

박연일

대전광역시 유성구 은구비남로 55 열매마을7단지
705동 401호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-003-1343

부처명 교육과학기술부

연구사업명 원천기술개발사업

연구과제명 Chlorella sp. ArM29 지질대사 재설계 기술 개발

기 여 율 1/3

주관기관 한국생명공학연구원

연구기간 2012.09.01 ~ 2013.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-0031343

부처명 교육과학기술부

연구사업명 글로벌프론티어 사업

연구과제명 에너지 미세조류 광합성 특성 분석을 통한 광합성 기구 개량

기 여 율 1/3

주관기관 차세대바이오매스 연구사업단

연구기간 2012.09.01 ~ 2013.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 KOPRI PE12030

부처명 국토해양부

연구사업명 기관주요사업

연구과제명 남극 킹조지섬의 생물 다양성과 생태계 변화 연구

기 여 율 1/3

주관기관 한국해양과학기술원 부설 극지연구소

연구기간 2011.01.01 ~ 2013.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

북극 해양 유래 전분 및 지질 고생산 미세조류인 클로렐라(*Chlorella* sp.) 세포주.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 세포주는 클로렐라 ArM29B(*Chlorella* sp. ArM29B) 세포주(KCTC 12331BP)인 것을 특징으로 하는 세포주.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 세포주의 전분 및 지질 생산량은 각각 세포주 건중량당 25~35% 및 35~45%인 것을 특징으로 하는 세포주.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 세포주는 4℃ 내지 36℃의 배양 온도에서 잘 자라는 것을 특징으로 하는 세포주.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 세포주는 주요 지방산으로서 올레익산(C18:1) 및 리놀레익산(C18:2)을 포함하는 것을 특징으로 하는 세포주.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 올레익산(C18:1) 및 리놀레익산(C18:2)의 함량은 전체 지질 중량 기준으로 50~60%인 것을 특징으로 하는 세포주.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 세포주는 민물 및 바닷물 모두에서 잘 자라는 것을 특징으로 하는 세포주.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 세포주는 다가 불포화지방산의 함량이 전체 지질 중량 기준으로 10% 이하인 것을 특징으로 하는 세포주.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 세포주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 지질 제조용 미생물 제제.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 지질은 올레익산(C18:1) 및 리놀레익산(C18:2)을 전체 지질 중량 기준으로 50~60% 함유하고, 다가 불포화지방산을 전체 지질 중량 기준으로 10% 이하로 함유하는 것을 특징으로 하는 지질 제조용 미생물 제제.

청구항 11

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 세포주를 배양하고, 그 배양액으로부터 지질을 분리하는 것을 특징으로 하는 지질의 제조 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 세포주의 배양은 4℃ 내지 36℃의 온도에서 수행되는 것을 특징으로 하는 지질의 제조 방법.

청구항 13

제11항의 방법에 의해 제조되며, 주요 지방산으로서 올레익산(C18:1) 및 리놀레익산(C18:2)을 포함하며, 올레익산(C18:1) 및 리놀레익산(C18:2)을 전체 지질 중량 기준으로 50~60% 함유하고, 다가 불포화지방산을 전체 지질 중량 기준으로 10% 이하로 함유하는 것을 특징으로 하는 지질.

청구항 14

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 세포주를 배양하는 단계;

상기 배양액으로부터 지질을 분리하는 단계; 및

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

청구항 15

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 세포주를 배양하는 단계;

상기 배양액으로부터 지질을 분리하는 단계; 및

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

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 기능성 전분 및 지질을 고농도로 축적하는 미세조류 클로렐라 세포주 및 이의 용도에 관한 것으로, 상세하게는 바이오디젤, 기능성 지질 생산에 사용할 수 있는 미세조류 클로렐라 세포주에 관한 것이다. 본 발명에 따른 클로렐라 ArM29B 세포주는 배양 중에 고농도로 전분 및 지질을 축적하는 세포주로 확인되었으며, 다양한 온도조건에서 배양이 가능하며, 세포 내 중성지방 방울을 특이적으로 염색할 수 있는 나일 레드(nile red) 분석법으로 고농도의 지질을 축적하는 것을 확인함으로써, 산업적으로 매우 유용한 미세조류이다.

배경기술

[0002] 최근 원유가격의 급격한 상승으로 생물자원을 활용한 대체 에너지 개발, 특히 생물연료(바이오에탄올, 바이오디젤) 생산이 주목을 받고 있지만, 작물을 이용한 생물연료의 생산은 경작지 확대에 따른 생태계 파괴, 식량부족 등의 문제를 야기한다. 그러나 광합성 미생물인 미세조류(microalgae)의 태양에너지 이용효율은 5% 정도로, 육상식물의 0.2%에 비해 약 25배 정도 높으며, 이산화탄소 고정화 속도는 소나무의 15배로 매우 효율적이다.

[0003] 또한, 미세조류의 단위면적당 바이오디젤 생산(오일 함량이 30%인 경우)은 약 58,700 L/ha로 대두의 446 L/ha에 비해 130배에 달한다. 미세조류는 유향 경작지를 이용한 배양, 균주개발의 용이성, 식량문제와 무관 등의 여러 가지 장점으로 인하여 장기적으로는 화석연료로부터 생산되는 디젤을 대체할 바이오디젤을 생산할 수 있는 유일한 자원으로 평가되고 있다. 또한 이산화탄소의 생물학적 전환 및 처리는 자연계 물질순환의 기본 원리인 광합성(photosynthesis)을 이용하는 것으로써 환경친화적 방법이며, 공정이 상온·상압에서 이루어지고, 생산된 바이오매스(biomass)를 유용물질로 활용한다는 장점이 있다.

[0004] 최근, 바이오에너지에 대한 수요 급증에 따른 경제성 있는 바이오에너지 생산의 소재(생물재료)가 요구되는데, 현재까지 미세조류 이용 바이오디젤 연구의 대부분이 지질생산을 많이 할 수 있는 종의 선발 및 지질 생산 조건에 집중되어 있으며, 세포 비파괴 추출 공법 및 세포 고밀도 배양 공법을 통해 지질 고생산 미세조류 클로렐라 및 클라미도모나스 세포주를 대량 배양하여 바이오연료와 같은 신재생에너지, 식품첨가물이나 의약품소재와 같은 바이오 화합물 그리고 베타카로티노이드와 같은 항산화 물질을 대량으로 생산할 수 있는 사업이 진행되고 있다.

[0005] 현재, 항산화물질, 식품 첨가물 사료 등으로 사용될 수 있는 미세조류(*Chlorella*, *Dunaliella*, *Haematococcus*, *Spirillum* 등)의 대량 배양 및 이용 기술이 개발되어 있으므로, 바이오디젤용 미세조류 대량배양에 적용이 가능하다. 높은 지질 함량 때문에 바이오디젤 생산에 있어서 가장 주목받아 온 미세조류 (특히, *Botryococcus*, *Schiochytrium* 등)의 경우, 주로 지질 함량을 높이기 위한 최적의 배양 조건을 찾는 데 연구개발이 집중되고 있다. 또한 지질을 높은 농도로 축적하는 미세조류의 경우 전형적으로 세포 내에 지질체(lipid body)를 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.

[0006] 그러나, 지질을 고농도로 축적하는 미세조류는 일부에 한정되어 있으며, 최적의 온도 및 특정 배양조건에서 지질을 축적하는 것이 일반적이다.

[0007] 한편, 한국공개특허 제2011-0125576호에는 북극 해양에서 분리한 지질 고생산 미세조류 클라미도모나스 세포주 및 이의 용도가 개시되어 있고, 일본등록특허 제3004510호에는 미세조류로부터의 에탄올 제조 프로세스가 개시되어 있으나, 본 발명에서와 같이 북극 해양에서 분리한 전분 및 지질 고생산 미세조류 클로렐라 세포주 및 이의 용도에 대해서는 밝혀진 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명은 다양한 온도조건에서 성장가능하면서 고농도로 전분 및 지질을 축적하여 바이오디젤 및 기능성 지질생산의 소재를 제공하는데 그 목적이 있다.

[0009] 따라서, 본 발명자들은 지질함량이 높아서 고급 지방산 생산 및 바이오에너지용으로 개발가능한 미세조류를 선발하기 위하여, 극지 미세조류 중 클로렐라 세포주들을 GC 분석법, 나일 레드(nile red) 염색법으로 스크리닝하여, 다양한 온도조건에서 고농도의 전분 및 지질을 축적하며 잘 자라는 클로렐라 ArM29B 세포주를 선발함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 북극 해양 유래 지질 고생산 미세조류인 클로렐라 ArM29B(*Chlorella* sp. ArM29B) 세포주를 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 세포주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 지질 제조용 미생물 제제를 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 세포주를 배양하고, 그 배양액으로부터 지질을 분리하는 것을 특징으로 하는 지질의 제조 방법을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조되며, 주요 지방산으로서 올레익산(C18:1) 및 리놀레익산(C18:2)을 포함하며, 올레익산(C18:1) 및 리놀레익산(C18:2)을 전체 지질 중량 기준으로 50~60% 함유하고, 다가 불포화지방산을 전체 지질 중량 기준으로 10% 이하로 함유하는 지질을 제공한다.

[0014] 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.

[0015] 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

[0016] 본 발명에 따른 클로렐라 ArM29B 세포주는 배양 중에 고농도로 전분 및 지질을 축적하는 세포주로 확인되었으며, 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.

[0017] 또한 클로렐라 ArM29B 세포주는 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

[0018] 도 1은 클로렐라 ArM29B 세포주(*Chlorella* sp. ArM29B)로 동정한 결과이다. ArM29B 및 *Chlorella* sp.인 클로렐라 소로키니아나(*Chlorella sorokiniana*, HM101339), 클로렐라 피레노이도사(*Chlorella pyrenoidosa*, AB240145), 아우제노클로렐라 프로토테코이데스(*Auxenochlorella protothecoides*, EU038285), 클로렐라 베리아빌리스(*Chlorella variabilis*, AB260903) 및 클로렐라 불가리스(*Chlorella vulgaris*, AB260909)의 *rbcl* 유전자의 서열 비교를 나타낸다.

도 2는 다양한 온도에서 본 발명의 클로렐라 ArM29B 세포주 성장물의 분석 결과를 나타낸다. 대조구는 클로렐라 불가리스(*Chlorella vulgaris*)가 사용되었다. 데이터는 평균 $\pm$ SD (n = 3)로 나타내었다.

도 3은 클로렐라 ArM29B 세포주의 옥외 배양결과로서 온도가 가장 높을 때의 온도가 수온 36℃에 달하는 조건에서 성장하는 것을 나타낸다.

도 4는 클로렐라 ArM29B 세포주의 질소 결핍 조건에서 배양된 세포의 전자현미경 관찰시 전분립(starch granules) 및 지질 유적(droplets)을 관찰한 결과이다. (a)는 ArM29B 세포의 공초점 현미경 관찰 결과로, 바는 5 μ m를 나타낸다. (B)는 ArM29B 세포의 TEM 분석 결과로, 바는 1 μ m를 나타낸다 ; S는 전분 과립, L은 지질 유적. (C)는 ArM29B의 지질 유적을 나일 레드 염색으로 관찰한 결과이다. 황색 및 적색은 지질 유적 및 엽록체를 각각 나타낸다.

도 5는 클로렐라 ArM29B 세포주에서 지방산 구성을 분석한 결과이다. 각 지방산 및 전체 지방산은 mg/세포 건중량으로 나타내었다.

도 6은 클로렐라 ArM29B 세포주에서 배양 기간에 따른 세포 내 전분 및 지방산 함량 변화를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 북극 해양 유래 전분 및 지질 고생산 미세조류인 클로렐라(*Chlorella* sp.) 세포주를 제공한다. 상기 세포주는 바람직하게는 클로렐라 ArM29B(*Chlorella* sp. ArM29B) 세포주(KCTC 12331BP)이다.

[0020] 상기 클로렐라 ArM29B 세포주는 북극해의 해빙으로부터 시료를 수집하고, 아가(agar) 배지 상에 도말하여 형성된 단일 콜로니를 선발하여, 18S rDNA 및 *rbcl* 유전자 서열분석을 통하여 동정 되었으며, 전분 및 지질 고생산 클로렐라 ArM29B 세포주를 확인하였다. 상기 전분 및 지질 고생산 클로렐라 ArM29B 세포주를 한국생명공학연구원(KCTC)에 2012년 12월 3일자로 기탁하였다(기탁번호: KCTC 12331BP).

[0021] 본 발명의 일 구현 예에 따른 클로렐라 세포주에서, 상기 세포주는 전분 및 지질을 고농도로 축적할 수 있으며, 바람직하게는 세포주의 전분 및 지질 생산량은 각각 세포주 건중량당 25~35% 및 35~45%일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 세포주의 전분 및 지질 생산량은 각각 세포주 건중량당 30% 및 39%일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0022] 본 발명의 일 구현 예에 따른 클로렐라 세포주에서, 상기 세포주는 다양한 배양 온도에서 전분 및 지질을 고농도로 축적할 수 있으며, 바람직하게는 상기 배양 온도는 4℃ 내지 36℃일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0023] 본 발명의 일 구현 예에 따른 클로렐라 세포주에서, 상기 세포주는 주요 지방산으로서 올레익산(C18:1) 및 리놀레익산(C18:2)을 포함하는 지질을 생산할 수 있으며, 바람직하게는 상기 올레익산(C18:1) 및 리놀레익산(C18:2)의 함량은 전체 지질 중량 기준으로 50~60%일 수 있고, 가장 바람직하게는 53~55%일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 세포주는 다가 불포화지방산(PUFA, Polyhydric unsaturated fatty acid)의 함량이 전체 지질 중량 기준으로 10% 이하일 수 있으며, 가장 바람직하게는 전체 지질 중량 기준으로 6~7%일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0024] 본 발명의 일 구현 예에 따른 클로렐라 세포주에서, 상기 세포주는 민물 및 바닷물 모두에서 잘 자랄 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0025] 또한, 본 발명은 상기 세포주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 지질 제조용 미생물 제제를 제공한다. 상기 미생물 제제는 클로렐라 ArM29B 세포주를 유효성분으로 포함할 수 있으며, 바이오오일의 대량 생산에 효과적으로 이용될 수 있다. 상기 대량 생산된 바이오오일은 트랜스에스테르화 과정을 통해 바이오디젤을 생산하는데 이용될 수 있다.

[0026] 본 발명의 일 구현 예에 따른 미생물 제제에서, 상기 지질은 올레익산(C18:1) 및 리놀레익산(C18:2)을 전체 지

질 중량 기준으로 50~60% 함유하고, 다가 불포화지방산을 전체 지질 중량 기준으로 10% 이하로 함유할 수 있으며, 바람직하게는 올레익산(C18:1) 및 리놀레익산(C18:2)을 전체 지질 중량 기준으로 53~55% 함유하고, 다가 불포화지방산을 전체 지질 중량 기준으로 6~7%로 함유할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0027] 또한, 본 발명은 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 4℃ 내지 36℃일 수 있다. 세포주 배양액으로부터 지질을 분리하는 방법은 당업계에 공지된 임의의 방법을 이용할 수 있다.
- [0028] 본 발명은 또한, 상기 지질의 제조 방법에 의해 제조된 지질을 제공한다.
- [0029] 본 발명의 일 구현 예에 따른 지질은 주요 지방산으로서 올레익산(C18:1) 및 리놀레익산(C18:2)을 포함하며, 올레익산(C18:1) 및 리놀레익산(C18:2)을 전체 지질 중량 기준으로 50~60% 함유하고, 다가 불포화지방산을 전체 지질 중량 기준으로 10% 이하로 함유할 수 있고, 바람직하게는 올레익산(C18:1) 및 리놀레익산(C18:2)을 전체 지질 중량 기준으로 53~55% 함유하고, 다가 불포화지방산을 전체 지질 중량 기준으로 6~7%로 함유할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0030] 본 발명은 또한, 본 발명의 세포주를 배양하는 단계;
- [0031] 상기 배양액으로부터 지질을 분리하는 단계; 및
- [0032] 상기 지질을 트랜스에스테르화시켜 지방산 에스테르 및 글리세롤을 생성하는 단계를 포함하는 바이오디젤의 제조 방법을 제공한다.
- [0033] 본 발명의 방법에서, 세포주의 배양은 바람직하게는 4℃ 내지 36℃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.
- [0034] 상기 트랜스에스테르화 과정은 바이오매스에 포함된 지방의 크고 가치를 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 절감할 수 있게 한다. 또한, 상기 트랜스에스테르화 과정의 반응 촉매제로서 수산화나트륨 또는 수산화칼륨을 사용할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0035] 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.
- [0036] 본 발명은 또한, 본 발명의 세포주를 배양하는 단계;
- [0037] 상기 배양액으로부터 지질을 분리하는 단계; 및
- [0038] 상기 지질을 트랜스에스테르화시켜 지방산 에스테르 및 글리세롤을 생성하는 단계를 포함하는 글리세롤의 제조 방법을 제공한다.
- [0039] 본 발명의 방법에서, 세포주의 배양 온도 및 배지 및 지질 분리 방법은 전술한 바와 같다.
- [0040] 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 다이아마이트 등의 제조에 이용될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0041] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

- [0042] **실험방법**
- [0043] **북극 미세조류 ArM29B 분리**
- [0044] 다산기지의 해빙(sea ice) 상에서 채취한 샘플을 아가 배지에 배양한 뒤 연속 희석하여 미세조류를 분리하였다. 이후 분리된 녹색 미세조류 군체를 Tris-acetate-phosphate(TAP) 배지(Harris 1989 The chlamydomonas sourcebook: a comprehensive guide to biology and laboratory use. Academic Press, San Diego, CA, 780)에서 배양하여 선발된 하나의 무균 라인을 현미경하에서 분석하고 ArM29B라 명명하였다. 이후 게놈 DNA를 분리하여 Hoham 등(Hoham et al. 2002 J. Phycol. 38, 1051-1064)의 방법에 따라 PCR 증폭으로 rbcL 유전자를 증폭하고 염기서열을 결정하였다. NCBI 데이터베이스에 BLASTN 검색 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 및 ClustalW2-Multiple Sequence Alignment (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) 분석 방법으로 ArM29B 및 근연종들의 rbcL 염기서열을 비교하였다.
- [0045] **배양조건**
- [0046] 본 발명에서는 ArM29B 및 클로렐라 불가리스 UTEX 395(*Chlorella vulgaris* UTEX 395)를 사용하였다. ArM29B 세포는 300 mM NaCl이 첨가된 TAP 배지에서 자랄 수 있었으나, NaCl이 첨가되지 않은 경우 더 잘 자랐다. 생장속도를 분석하기 위하여, 약 2×10^5 세포를 50ml TAP 액체 배지에 접종하여 4, 15, 25℃ 온도조건에서 200 rpm으로 현탁배양하면서 $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 의 연속 광조건 하에서 배양하였다. 세포의 증식 정도를 흡광도(OD_{750})로 9일 동안 매 24시간마다 측정하였다. 지방산 분석에는 약 2×10^5 세포를 질소 결핍 TAP (TAP 염에서 NH_4Cl 제거) 배지 50ml에 접종하여 25℃에서 배양하며 12일째, 15일째 세포를 수확하여 분석에 사용하였다.
- [0047] **지방산 분석**
- [0048] 동결건조된 20mg의 세포를 Sasser (1990 Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. Microbial ID Inc., Newark, Del)의 방법에 따라 전체 지질을 분리하였다. 이후 Hexane/methyl tert-butyl ether (1:1)을 사용하여 지방산을 추출하였다. 지방산 분석은 GC(YL 6100 GC, Young Lin, Korea)를 사용하였다. 검출기는 불꽃이온화검출기(FID)를 사용하였으며, 각 지방산의 성분(각 FAME)은 Supelco® 37 Component FAME Mix (시그마, USA)를 사용하여 동정 및 양을 결정하였다.
- [0049] **전자현미경 분석/TEM(Transmission electron microscopy)**
- [0050] 질소원 결핍 배지에서 7일간 배양된 세포를 250 mM 포스페이트 버퍼(pH 7.0)로 2회 수세하고 2.5%(v/v) 글루타르알데히드/1%(v/v) 오스뮴 테트라옥사이드(osmium tetroxide) 용액에 고정하였다. 탈수를 위하여 농도 구배의 에탄올(50-100%)을 사용하였다. 시료를 스퍼 레진(Spurr's resin)에 포매하여(embedding) 울트라마이크로톰(ultramicrotome, Ultracut UCT, LEICA, Germany)을 사용하여 박편을 제작하고 우라닐 아세테이트로 염색하였다. 준비된 시료를 TEM(transmission electron microscope, Tecnai, FEI, 네덜란드)으로 관찰하였다.
- [0051] **나일 레드 염색법에 의한 지질 유적(droplet) 관찰**
- [0052] 세포를 나일 레드($1 \mu\text{g/ml}$, 9-diethylamino-5H-benzo [a]phenoxazine-5-one; Sigma-Aldrich, USA)가 첨가된 아세톤에 넣어 30분간 반응하여 염색하였다. 염색된 세포 내 지질을 공초점 현미경 (Zeiss LSM 5 PASCAL confocal microscope system with PASCAL version 4.0 software (Jena, Germany))으로 관찰하였다.
- [0053] **실시예 1. 클로렐라 ArM29B의 분리 및 동정**
- [0054] ArM29B의 rbcL 염기서열은 클로렐라 종들과 매우 높은 상동성(identity)를 나타냈다; 클로렐라 피레노이도사

(*Chlorella pyrenoidosa*, 96%), 클로렐라 불가리스(*Chlorella vulgaris*, 94%)(도 1). 그러나 클라미도모나스(*Chlamydomonas*) 및 세네데스무스(*Senedesmus*) 등을 포함하는 다른 미세조류와는 90% 이하의 상동성을 보였다. 따라서 ArM29B는 클로렐라 종(*Chlorella* sp.)으로 분류되었다. 다양한 온도에서 생장속도를 비교한 결과 조사한 모든 온도에서 대조구인 클로렐라 불가리스보다 빠른 생장을 보였다(도 2). 특히 ArM29B의 자연서식지는 극지임에도 불구하고 25℃에서도 빠르게 생장하였으며(도 2), 실외배양에서는 수온 36℃에서도 생장하였다(도 3).

[0055] 실시예 2. 클로렐라 ArM29B 세포주의 상대적 지질함량 분석

[0056] ArM29B 세포는 직경이 4-8 μ m인 구형이고, 편모를 가지지 않았다. 질소 결핍 조건에서 배양된 세포는 전자현미경 관찰시 전분립(starch granules) 및 지질 유적(droplets)으로 꽉 차 있었다(도 4). GC 분석으로 지방산을 분석한 결과 전체 지방산의 함량은 건중량의 39%이고 주요 지방산은 C16:0, C18:1 및 C18:2이다(도 5). C18:1 및 C18:2 지방산은 54%로 매우 높았으며, 3개 이상의 이중결합을 가지는 다가 불포화지방산(PUFA, Polyhydric unsaturated fatty acid)의 함량은 7%로 매우 낮았다. 이처럼 PUFA의 함량이 낮고, C18:1 및 C18:2 지방산의 함량이 높은 것은 바이오디젤 생산에 이용하기에 매우 우수함을 나타낸다.

[0057] 또한, 클로렐라 ArM29B 세포주에서 배양 기간에 따른 세포 내 전분 및 지방산 함량 변화를 분석한 결과(도 6), 건중량당 전분 함량은 30%까지 증가하다가 배양 7일 후에는 전분 함량은 감소한 반면, 지방산 함량은 배양 초기에 서서히 증가하다가 배양 7일 후부터 급격히 증가하여 건중량당 지방산 함량은 39%까지 증가하였다.

수탁번호

[0058]

기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC12331BP

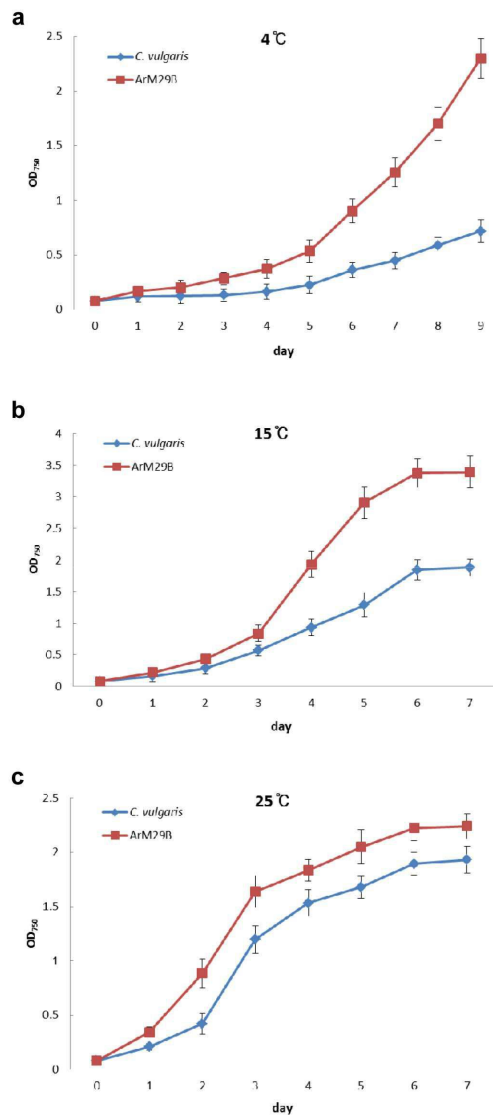
수탁일자 : 20121203

도면

도면1

[illegible]

도면2

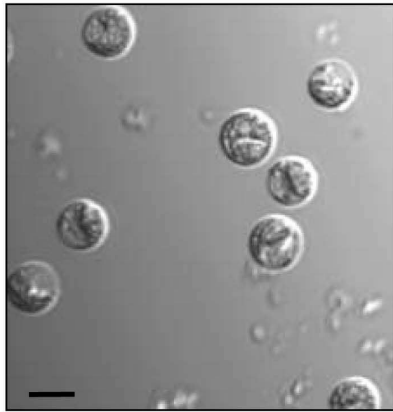


도면3

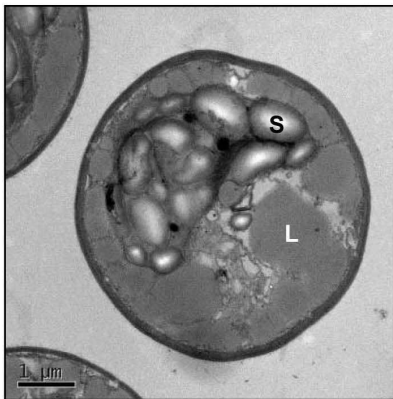


도면4

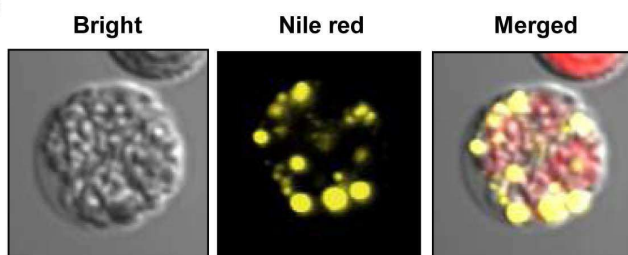
a



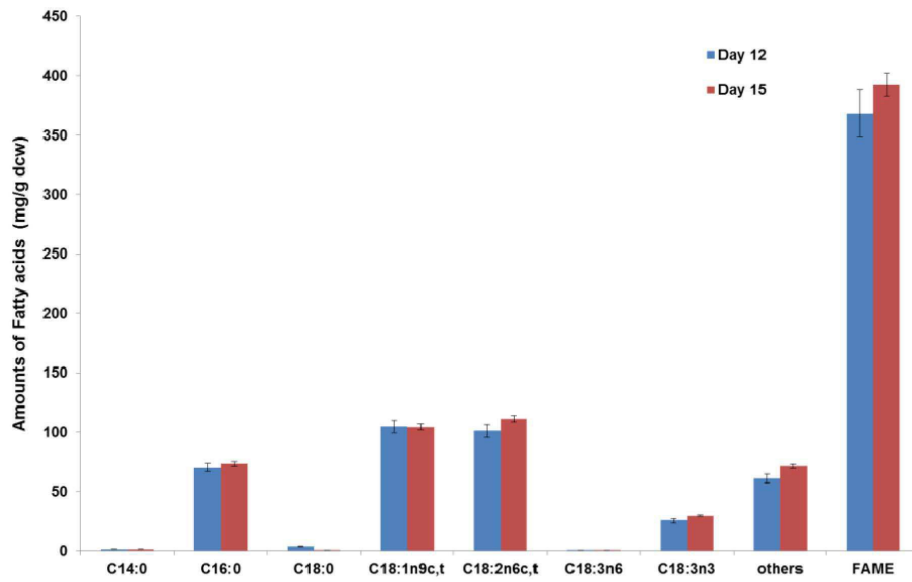
b



c



도면5



도면6

