



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년04월07일

(11) 등록번호 10-1508993

(24) 등록일자 2015년03월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/12 (2006.01) *C12N 13/00* (2006.01)
C12P 7/64 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0041784

(22) 출원일자 2013년04월16일

심사청구일자 2013년04월16일

(65) 공개번호 10-2014-0124266

(43) 공개일자 2014년10월24일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020120127685 A

KR1020100125104 A

KR101107100 B1

KR1020110125576 A

(73) 특허권자

한국원자력연구원

대전광역시 유성구 대덕대로989번길 111(덕진동)

(72) 발명자

최종일

광주광역시 남구 효사랑길 14, 105-802 (봉선동, 포스코디샵아파트)

윤민철

대전광역시 유성구 송강로42번길 61, 308-809 (송강동, 송강청솔아파트)

김동호

전라북도 정읍시 정주2길 13-28 (금봉동)

(74) 대리인

특허법인 플러스

전체 청구항 수 : 총 6 항

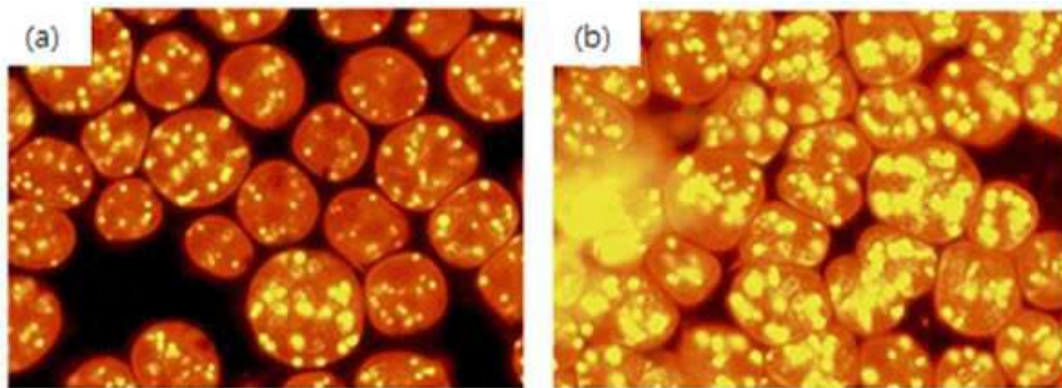
심사관 : 김정아

(54) 발명의 명칭 방사선 조사에 의해 지질 함량이 높은 클라미도모나스 레인하르티 M4013, 이의 생산방법 및 상기 클라미도모나스 레인하르티 M4013를 이용한 바이오 디젤의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 방사선 조사에 의해 지질 함량이 높은 클라미도모나스 레인하르티 M4013, 이의 생산방법 및 상기 클라미도모나스 레인하르티 M4013를 이용한 바이오 디젤의 제조방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 미세조류의 일종인 클라미도모나스 레인하르티에 방사선을 조사하여 지질 함량이 높은 클라미도모나스 레인하르티 M4013, 이의 생산방법을 제공하며, 바이오 디젤의 제조방법에 있어서, 상기 방사선 조사에 의해 지질 함량이 높은 클라미도모나스 레인하르티 M4013를 이용한 바이오 디젤을 제조하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 527510-12

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 기초기술연구회

연구사업명 한국원자력연구원연구운영비지원

연구과제명 방사선 이용 거대조류 육종기술 개발 및 유용 유전자원확보 연구

기 여 율 1/1

주관기관 한국원자력연구원 정읍 방사선과학연구소

연구기간 2012.01.01 ~ 2012.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

클라미도모나스 레인하르티에 방사선을 조사하여 얻어진 클라미도모나스 레인하르티의 지질 함량은 방사선을 조사하지 않은 클라미도모나스 레인하르티의 지질 함량보다 30% 이상 높은 것을 특징으로 하는 수탁번호가 KCTC 18236P인 클라미도모나스 레인하르티 M4013.

청구항 2

삭제

청구항 3

제 1항에 있어서,

방사선은 감마선, 전자선, X-선 중에서 선택된 하나 또는 둘 이상인 것을 특징으로 하는 수탁번호가 KCTC 18236P인 클라미도모나스 레인하르티 M4013.

청구항 4

제 1항에 있어서,

방사선의 조사는 흡수선량이 10kGy 이하가 되도록 실시하는 것을 특징으로 하는 수탁번호가 KCTC 18236P인 클라미도모나스 레인하르티 M4013.

청구항 5

클라미도모나스 레인하르티에 방사선을 조사 후 배양하여 생존한 클라미도모나스 레인하르티를 선별하는 단계;

상기의 방사선 조사 후 생존한 클라미도모나스 레인하르티의 지질 함량이 방사선을 조사하지 않은 클라미도모나스 레인하르티의 지질 함량에 비해 30% 초과하는 방사선 조사 후 생존한 클라미도모나스 레인하르티를 선별하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 지질 함량이 높은 수탁번호가 KCTC 18236P인 클라미도모나스 레인하르티 M4013의 생산방법.

청구항 6

바이오 디젤의 제조방법에 있어서,

제1항의 수탁번호가 KCTC 18236P인 클라미도모나스 레인하르티 M4013을 트랜스에스테르화 반응을 시켜 바이오 디젤을 제조하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 바이오 디젤의 제조방법.

청구항 7

바이오 디젤의 제조방법에 있어서,

제1항의 제조된 수탁번호가 KCTC 18236P인 클라미도모나스 레인하르티 M4013으로부터 얻은 지질을 트랜스에스테르화 반응을 시켜 바이오 디젤을 제조하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 바이오 디젤의 제조방법.

발명의 설명

기술분야

본 발명은 방사선 조사에 의해 지질 함량이 높은 클라미도모나스 레인하르티 M4013, 이의 생산방법 및 상기 클라미도모나스 레인하르티 M4013을 이용한 바이오 디젤의 제조방법에 관한 것으로서 보다 상세하게는 미세조류의 일종인 클라미도모나스 레인하르티에 방사선을 조사하여 지질 함량이 높은 돌연변이 세포주 클라미도모나스 레인하르티 M4013, 이의 생산방법을 제공하며, 바이오 디젤의 제조방법에 있어서, 상기 방사선 조사에 의해 지질

[0001]

함량이 높은 클라미도모나스 레인하르트티 M4013을 이용한 바이오 디젤을 제조하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 최근 원유가격의 급격한 상승으로 생물자원을 활용한 대체에너지 개발, 특히 바이오에탄올, 바이오디젤 등의 생물연료 생산이 주목을 받고 있지만, 작물을 이용한 생물연료의 생산은 경작지 확대에 따른 생태계 파괴, 식량부족 등의 문제를 야기한다.
- [0003] 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(Matsumoto, H., N. Shioji, A. Hamasaki, Y. Ikuta, Y. Fukuda, M. Sato, N. Endo, and T. Tsukamoto. 1995. Carbon dioxide fixation by microalgae photosynthesis using actual flue gas discharged from a boiler. Appl. Biochem. Biotech. 51/52: 681??692.). 특히, 미세조류의 단위면적당 바이오디젤 생산(oil 함량이 30% 인 경우)은 약 58,700L/ha로 대두의 446L/ha에 비해 130배에 달한다(Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. Biotechnol. Adv. 25: 294??306.).
- [0004] 미세조류는 유향 경작지를 이용한 배양, 식량문제와 무관 등의 여러 가지 장점으로 인하여 장기적으로는 화석연료로부터 생산되는 디젤을 대체할 바이오디젤을 생산할 수 있는 유일한 자원으로 평가되고 있다. 또한 미세조류는 이산화탄소를 고정화하여 지질을 축적하기 때문에 지구 온난화를 야기하는 이산화탄소의 생물학적 전환 및 처리를 한다는 장점도 있다.
- [0005] 미세조류 중에서 클라미도모나스 레인하르트티(Chlamydomonas reinhardtii)는 단세포 녹조류(Chlorophyta)로서 민물, 해양 등의 다양한 환경에 분포하는 진핵생물이며, 6 ~ 8 시간의 doubling time을 가지고 있다. 일반적으로 클라미도모나스는 지질 함량이 16 ~ 20%로서 지질 고함류 미세조류 보다는 함량이 낮지만 빠른 증식 속도와 생리, 생화학, 분자생물학, 유전체 연구 등이 가장 앞서 있어서 바이오디젤 생산을 위해 이용되고 있는 중이다. 이에 대하여 대한민국 공개특허 KR 2011-0125576(특허문헌 1)에 개시된 바 있다. 하지만, 경제적인 바이오디젤의 생산을 위해서는 보다 높은 지질 함량을 갖는 클라미도모나스 세포주의 개발이 필요한 실정이다. 하지만, 이러한 지질 고함류 세포주를 개발하기위해 필요한 분자생물학적 형질전환기술을 통한 안정한 형질전환체 기술이 개발이 되지 못하여 세포주 개발 연구에 한계가 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0006] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 KR 2011-0125576

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명의 목적은 방사선 조사에 의해 지질 함량이 높은 클라미도모나스 레인하르트티 M4013 및 이의 생산방법을 제공하고자 한다.
- [0008] 본 발명의 다른 목적은 바이오 디젤의 제조방법에 있어서, 상기 방사선 조사에 의해 지질 함량이 높은 클라미도모나스 레인하르트티 M4013을 이용하여 바이오 디젤을 제조하는 방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0009] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 클라미도모나스 레인하르트티에 방사선을 조사하여 지질 함량이 높은 클라미도모나스 레인하르트티 M4013(기탁번호 : KCTC 18236P)를 제공할 수 있다.
- [0010] 또한 본 발명은 클라미도모나스 레인하르트티에 방사선을 조사 후 배양하여 생존한 클라미도모나스 레인하르트티를 선별하는 단계; 상기의 방사선 조사 후 생존한 클라미도모나스 레인하르트티의 지질 함량이 방사선을 조사하지 않은 클라미도모나스 레인하르트티의 지질 함량에 비해 30% 초과하는 방사선 조사 후 생존한 클라미도모나스 레인하르트티를 선별하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 지질 함량이 높은 클라미도모나스 레인하르트티 M4013(기탁번호 : KCTC 18236P)의 생산방법을 제공할 수 있다.

[0011] 또한 본 발명은 상기 클라미도모나스 레인하르티 M4013(기탁번호 : KCTC 18236P)를 트랜스에스테르화 반응을 시켜 바이오 디젤을 제조하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 바이오 디젤의 제조방법을 제공할 수 있다.

[0012] 또한 본 발명은 상기 클라미도모나스 레인하르티 M4013(기탁번호 : KCTC 18236P)로부터 얻은 지질을 트랜스에스테르화 반응을 시켜 바이오 디젤을 제조하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 바이오 디젤의 제조방법을 제공할 수 있다.

발명의 효과

[0013] 본 발명에 의해 보통의 클라미도모나스 레인하르티에 비해 지질 함량이 높은 클라미도모나스 레인하르티 M4013 및 이의 생산방법을 제공할 수 있다.

[0014] 본 발명에 의해 보통의 클라미도모나스 레인하르티에 비해 지질 함량이 높은 클라미도모나스 레인하르티 M4013을 바이오 디젤 제조시의 재료로 사용하여 보통의 클라미도모나스 레인하르티에 비해 생산성이 높고 경제적인 바이오 디젤을 생산할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1(a)는 방사선을 조사하지 않은 클라미도모나스 레인하르티 (*Chlamydomonas reinhardtii*)의 지질 염색을 나타낸 사진이고, 도 1(b)는 본 발명의 클라미도모나스 레인하르티 M4013(*Chlamydomonas reinhardtii* M4013, 기탁번호 : KCTC 18236P)의 지질 염색을 나타낸 사진이다.

도 2는 방사선을 조사하지 않은 클라미도모나스 레인하르티(*Chlamydomonas reinhardtii*)와 본 발명의 방사선을 조사 후 생존한 클라미도모나스 레인하르티 M4013(*Chlamydomonas reinhardtii* M4013, 기탁번호 : KCTC 18236P)의 지질 함량을 나타낸 그래프이다(도 2에서 방사선을 조사하지 않은 클라미도모나스 레인하르티는 "모균주 *Chlamydomonas reinhardtii*"이고, 본 발명의 클라미도모나스 레인하르티 M4013(*Chlamydomonas reinhardtii* M4013, 기탁번호 : KCTC 18236P)는 "돌연변이 *Chlamydomonas reinhardtii*"를 나타낸다.)

도 3은 본 발명의 방사선을 조사 후 생존한 클라미도모나스 레인하르티 M4013와 방사선을 조사 후 생존한 세네 데스무스 디모르푸스 6G(대한민국 공개특허 10-2012-0127685 참고) 의 주차별 광학밀도를 조사한 그래프를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 방사선 조사를 통한 육종은 방사선 조사에 따른 생물체 염색체의 분해와 재결합과정에서의 오류를 이용하여 염색체의 변이를 주는 기술로서 이미 미생물이나 육상식물의 육종에 널리 사용된 기술로 최근에도 균주의 개량을 위해 이용되고 있다.

[0017] 이에 본 발명자는 미세조류 클라미도모나스 레인하르티(*Chlamydomonas reinhardtii*)의 품종 개량에 대해 연구하던 중 클라미도모나스 레인하르티(*Chlamydomonas reinhardtii*)에 방사선 조사를 통하여 지질 함량이 높은 클라미도모나스 레인하르티 M4013(*Chlamydomonas reinhardtii* M4013, 기탁번호 : KCTC 18236P)를 얻고 이러한 클라미도모나스 레인하르티 M4013(*Chlamydomonas reinhardtii* M4013)의 생산방법 및 이를 이용한 바이오 디젤 생산 용도를 제공할 수 있음을 알게 되어 본 발명을 완성하였다.

[0018] 본 발명은 지질 함량이 높은 클라미도모나스 레인하르티 M4013(기탁번호 : KCTC 18236P)를 나타낸다.

[0019] 구체적으로 본 발명은 클라미도모나스 레인하르티(*Chlamydomonas reinhardtii*)에 방사선을 조사하여 지질 함량이 높은 클라미도모나스 레인하르티 M4013(기탁번호 : KCTC 18236P)를 나타낸다.

[0020] 상기에서 클라미도모나스 레인하르티 M4013(기탁번호 : KCTC 18236P)의 지질 함량은 방사선을 조사하지 않은 클라미도모나스 레인하르티의 지질 함량에 비해 30% 이상 지질 함량이 높은 것을 나타낸다.

[0021] 상기에서 클라미도모나스 레인하르티(*Chlamydomonas reinhardtii*)에 조사하는 방사선은 감마선, 전자선, X-선 중에서 선택된 하나 또는 둘 이상을 사용할 수 있다.

[0022] 상기에서 방사선은 흡수선량이 10kGy 이내가 되도록 클라미도모나스 레인하르티(*Chlamydomonas reinhardtii*)에 방사선을 조사할 수 있다.

[0023] 상기에서 방사선은 흡수선량이 0.1~10kGy이 되도록 클라미도모나스 레인하르티(*Chlamydomonas reinhardtii*)에

방사선을 조사할 수 있다.

- [0024] 상기에서 방사선은 흡수선량이 0.1~5kGy이 되도록 클라미도모나스 레인하르티(*Chlamydomonas reinhardtii*)에 방사선을 조사할 수 있다.
- [0025] 본 발명의 클라미도모나스 레인하르티 M4013(*Chlamydomonas reinhardtii* M4013)는 클라미도모나스 레인하르티(*Chlamydomonas reinhardtii*)에 방사선을 조사한 후 생존한 클라미도모나스 레인하르티가 방사선을 조사하지 않은 클라미도모나스 레인하르티에 비해 지질 함량이 높은 클라미도모나스 레인하르티를 선별하여 이를 클라미도모나스 레인하르티 M4013(*Chlamydomonas reinhardtii* M4013)로 명명하고 2013년 1월 22일 한국생물공학연구원 미생물자원센터(KCTC)에 미생물 기탁번호 KCTC 18236P 로 기탁하였다.
- [0026] 본 발명은 지질 함량이 높은 클라미도모나스 레인하르티 M4013(기탁번호 : KCTC 18236P)의 생산방법을 나타낸다.
- [0027] 본 발명은 클라미도모나스 레인하르티(*Chlamydomonas reinhardtii*)에 방사선을 조사 후 배양하여 생존한 클라미도모나스 레인하르티를 선별하는 단계; 상기의 방사선 조사 후 생존한 클라미도모나스 레인하르티의 지질 함량이 방사선을 조사하지 않은 클라미도모나스 레인하르티의 지질 함량에 비해 30% 이상 많은 방사선 조사 후 생존한 클라미도모나스 레인하르티를 선별하는 단계를 포함하는 지질 함량이 높은 클라미도모나스 레인하르티 M4013(기탁번호 : KCTC 18236P)의 생산방법을 제공한다. 이때 배양기간은 약 2주인 것을 특징으로 한다. 클라미도모나스는 세네데스무스 보다 성장 속도가 빠르기 때문에 세네데스무스는 3 주에서 4주 배양 후에 지질 함량을 측정하지만 클라미도모나스는 2주 배양 후 함량을 측정해서 우수 돌연변이를 선별할 수 있다.
- [0028] 상기의 지질 함량이 높은 클라미도모나스 레인하르티 M4013(기탁번호 : KCTC 18236P)의 생산시 상기 지질 함량은 방사선을 조사하지 않은 클라미도모나스 레인하르티의 지질 함량에 비해 30% 이상 지질 함량이 높은 것을 나타낸다.
- [0029] 상기의 지질 함량이 높은 클라미도모나스 레인하르티 M4013(기탁번호 : KCTC 18236P)의 생산시 클라미도모나스 레인하르티(*Chlamydomonas reinhardtii*)에 조사하는 방사선은 감마선을 사용할 수 있다.
- [0030] 상기의 지질 함량이 높은 클라미도모나스 레인하르티 M4013(기탁번호 : KCTC 18236P)의 생산시 클라미도모나스 레인하르티(*Chlamydomonas reinhardtii*)에 조사하는 방사선은 전자선을 사용할 수 있다.
- [0031] 상기의 지질 함량이 높은 클라미도모나스 레인하르티 M4013(기탁번호 : KCTC 18236P)의 생산시 클라미도모나스 레인하르티(*Chlamydomonas reinhardtii*)에 조사하는 방사선은 X-선을 사용할 수 있다.
- [0032] 상기의 지질 함량이 높은 클라미도모나스 레인하르티 M4013(기탁번호 : KCTC 18236P)의 생산시 클라미도모나스 레인하르티(*Chlamydomonas reinhardtii*)에 조사하는 방사선은 감마선, 전자선, X-선 중에서 선택된 2종 이상을 사용할 수 있다.
- [0033] 상기의 지질 함량이 높은 클라미도모나스 레인하르티 M4013(기탁번호 : KCTC 18236P)의 생산시 방사선은 흡수선량이 10kGy 이내가 되도록 클라미도모나스 레인하르티(*Chlamydomonas reinhardtii*)에 방사선을 조사할 수 있다.
- [0034] 상기의 지질 함량이 높은 클라미도모나스 레인하르티 M4013(기탁번호 : KCTC 18236P)의 생산시 방사선은 흡수선량이 0.1~10kGy이 되도록 클라미도모나스 레인하르티(*Chlamydomonas reinhardtii*)에 방사선을 조사할 수 있다.
- [0035] 상기의 지질 함량이 높은 클라미도모나스 레인하르티 M4013(기탁번호 : KCTC 18236P)의 생산시 방사선은 흡수선량이 0.1~5kGy이 되도록 클라미도모나스 레인하르티(*Chlamydomonas reinhardtii*)에 방사선을 조사할 수 있다.
- [0036] 상기의 지질 함량이 높은 클라미도모나스 레인하르티 M4013(기탁번호 : KCTC 18236P)의 생산시 클라미도모나스 레인하르티 (*Chlamydomonas reinhardtii*)에 방사선을 조사한 후 배양하는 배지는 Modified bold's Basal medium 배지를 사용할 수 있다.
- [0037] 상기의 Modified bold's Basal medium 배지는 1L의 멸균수에 NaNO_3 0.2465g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.0249g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.07395g, K_2HPO_4 0.07490g, KH_2PO_4 0.175g, NaCl 0.02513g, $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$ (EDTA) 0.04968g, KOH 30.86mg, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4.98mg, H_2SO_4 0.98mg, H_3BO_3 11.13mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 8.83mg, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.44mg, MoO_3 6.06 mg, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1.57mg, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.49mg, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.19mg.을 첨가하여 제조 할 수 있다.
- [0038] 상기에서 클라미도모나스 레인하르티 M4013(*Chlamydomonas reinhardtii* M4013) 제조시 클라미도모나스 레인하르티

티 (*Chlamydomonas reinhardtii*)에 방사선을 조사한 후 배양은 광도 >20 $\mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 12:12 Light:Dark cycle, 13~25°C의 온도에서 10~21일 동안 실시할 수 있다.

- [0039] 또한 본 발명에서 방사선을 조사 및 배양한 클라미도모나스 레인하르티에 추가적으로 가열처리 하는 단계를 추가적으로 실시할 수 있다. 가열처리는 크게 제한되는 것은 아니나, 50~150°C, 구체적으로는 80~130°C에서 1~10시간 수행할 수 있다. 이렇게 함으로써 방사선 조사 후 생존하는 비돌연변이 클라미도모나스 레인하르티와 돌연변이 클라미도모나스 레인하르티 균주들 중에서 돌연변이 클라미도모나스 레인하르티 균주의 선별 확률을 증가시킬 수 있다.
- [0040] 상기에서 언급한 방법에 의해 제조한 본 발명의 방사선 흡수선량이 0.1~10kGy이 되도록 클라미도모나스 레인하르티(*Chlamydomonas reinhardtii*)에 방사선을 조사한 후 방사선 조사 후에 생존한 클라미도모나스 레인하르티(*Chlamydomonas reinhardtii*)가 방사선을 조사하지 않은 클라미도모나스 레인하르티(*Chlamydomonas reinhardtii*)에 비해 지질 함량이 30% 이상 높은 균주를 선별하여 이를 클라미도모나스 레인하르티 M4013(*Chlamydomonas reinhardtii* M4013)로 명명하고 2013년 1월 22일 한국생물공학연구원 미생물자원센터(KCTC)에 미생물 기탁번호 KCTC 18236P 로 기탁하였다.
- [0041] 본 발명의 지질 함량이 높은 클라미도모나스 레인하르티 M4013 및 이의 생산방법에 대해 다양한 조건으로 실시한바, 본 발명의 목적을 달성하기 위해서는 상기에서 언급한 조건에 의해 지질 함량이 높은 클라미도모나스 레인하르티 M4013 및 이의 생산방법을 제공하는 것이 바람직하다.
- [0042] 본 발명은 상기에서 언급한 지질 함량이 높은 클라미도모나스 레인하르티 M4013을 이용한 바이오 디젤의 제조방법을 포함한다.
- [0043] 본 발명은 상기에서 언급한 지질 함량이 높은 클라미도모나스 레인하르티 M4013을 생산하는 방법에 의해 생산된 지질 함량이 높은 클라미도모나스 레인하르티 M4013을 이용한 바이오 디젤의 제조방법을 포함한다.
- [0044] 본 발명은 바이오 디젤의 제조방법에 있어서, 상기에서 언급한 클라미도모나스 레인하르티 M4013(기탁번호 : KCTC 18236P) 또는 상기에서 언급한 지질 함량이 높은 클라미도모나스 레인하르티 M4013을 생산하는 방법에 의해 생산된 클라미도모나스 레인하르티 M4013(기탁번호 : KCTC 18236P)를 트랜스에스테르화 반응을 시켜 바이오 디젤을 제조하는 단계를 포함하는 바이오 디젤의 제조방법을 나타낸다.
- [0045] 본 발명은 바이오 디젤의 제조방법에 있어서, 상기에서 언급한 클라미도모나스 레인하르티 M4013(기탁번호 : KCTC 18236P) 또는 상기에서 언급한 지질 함량이 높은 클라미도모나스 레인하르티 M4013을 생산하는 방법에 의해 생산된 클라미도모나스 레인하르티 M4013(기탁번호 : KCTC 18236P)로부터 얻은 지질을 트랜스에스테르화 반응을 시켜 바이오 디젤을 제조하는 단계를 포함하는 바이오 디젤의 제조방법을 나타낸다.
- [0046] 상기에서 트랜스에스테르화 반응은 종래 바이오 디젤 제조 시 사용하는 트랜스에스테르화 반응 공정을 이용하여 실시할 수 있다. 이러한 트랜스에스테르화 반응 공정은 당업자가 적의 선택하여 실시할 수 있으면 족하므로 이에 대한 자세한 내용은 생략하기로 한다.
- [0047] 이하 본 발명의 내용을 실시예, 시험예 및 적용예를 통하여 구체적으로 설명한다. 그러나, 이들은 본 발명을 보다 상세하게 설명하기 위한 것으로 본 발명의 권리범위가 이들에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [0048] <실시예1> 방사선 조사에 의한 클라미도모나스 레인하르티 M4013(*Chlamydomonas reinhardtii* M4013) 제조
- [0049] 클라미도모나스 레인하르티(*Chlamydomonas reinhardtii*)는 University of Texas, USA로부터 분양 받아 사용하였다.
- [0050] 클라미도모나스 레인하르티(*Chlamydomonas reinhardtii*)의 배양은 Modified bold's Basal medium 배지를 사용하였으며, 이때 Modified bold's Basal medium 배지의 조성은 1L의 멸균수에 NaNO_3 0.2465g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.0249g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.07395g, K_2HPO_4 0.07490g, KH_2PO_4 0.175g, NaCl 0.02513g, $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$ (EDTA) 0.04968g, KOH 30.86mg, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4.98mg, H_2SO_4 0.98mg, H_3BO_3 11.13mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 8.83mg, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.44mg, MoO_3 6.06 mg, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1.57mg, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.49mg, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.19mg 을 포함하도록 하였다.

- [0051] 클라미도모나스 레인하르티 (*Chlamydomonas reinhardtii*)를 Modified bold's Basal medium 배지에 넣은 다음 Plant culture dish(100×40mm)에 100mL의 부피로 넣고 광도 20 μmol photon m⁻²s⁻¹, 12:12 Light:Dark cycle, 온도 20℃를 유지하여 14일 동안 배양하였다.
- [0052] 클라미도모나스 레인하르티(*Chlamydomonas reinhardtii*)에 방사선의 조사는 Modified bold's Basal medium 배지에서 배양중인 미세조류에 Co-60 조사장치(point source, AECL, IR-79, Nordion, Canada)를 이용하여 각각 0kGy, 0.1kGy, 0.2kGy, 0.5kGy, 1kGy의 흡수선량이 되도록 감마선을 조사하였다. 감마선의 선량측정은 알려진 선량계(alanine dosimeters, Bruker Instruments, Rheinstetten, Germany)를 이용하여 Bruker EMS 104 EPR Analyzer로 분석하였다.
- [0053] 방사선 조사 후 각각의 방사선이 조사된 클라미도모나스 레인하르티(*Chlamydomonas reinhardtii*) 시료는 Modified bold's Basal medium 배지에 옮겨 상기의 클라미도모나스 레인하르티(*Chlamydomonas reinhardtii*)을 Modified bold's Basal medium 배지에서 배양시 언급한 동일한 조건으로 배양하였으며 흡광도 측정으로 미세조류의 생존율을 분석하였다.
- [0054] 방사선 조사 후 생존한 클라미도모나스 레인하르티(*Chlamydomonas reinhardtii*)는 다시 Modified bold's Basal medium 배지에서 배양시 언급한 동일한 조건으로 배양하였다.
- [0055] 방사선 조사 후 생존한 클라미도모나스 레인하르티 (*Chlamydomonas reinhardtii*)를 Modified bold's Basal medium 배지에 배양하여 얻은 미세조류 중에서 방사선을 조사하기 전의 클라미도모나스 레인하르티 (*Chlamydomonas reinhardtii*) 보다 30% 이상의 지질 함량을 갖는 미세조류를 선별하여 클라미도모나스 레인하르티 M4013(*Chlamydomonas reinhardtii* M4013) 로 명명하였으며, 2013년 1월 22일 한국생물공학연구원 미생물 자원센터(KCTC)에 미생물 기탁번호 KCTC 18236P 로 기탁하였다.
- [0056] 지질의 Nile red 염색법은 다음과 같다. 아세톤에 Nile Red 염색약을 250mg/L 비율로 녹여 염색 지시약 만든다. sample에 염색 지시약을 첨가하여 지질을 염색시킨다. 지질 함량이 높은 균주의 선별은 sample 10ml 당 염색 지시약을 40μl씩 첨가하여 지질을 염색시키고 vortex 후 10분 정치 후 형광측정기로 값을 비교한다.
- [0057] 도 1(a)에서 방사선을 조사하기 전의 클라미도모나스 레인하르티(*Chlamydomonas reinhardtii*)와 본 발명에 의해 제조한 방사선을 조사한 후 생존한 클라미도모나스 레인하르티 M4013(*Chlamydomonas reinhardtii* M4013)(도 1(b) 참조)의 지질을 염색한 사진으로부터 얻어진 돌연변이 클라미도모나스 레인하르티 M4013(*Chlamydomonas reinhardtii* M4013)가 더 높은 지질 함량을 갖는 것을 확인할 수 있었다.
- [0058] <실시예2> 클라미도모나스 레인하르티 M4013(*Chlamydomonas reinhardtii* M4013)의 지질 함량 평가
- [0059] Nile red 염색법은 대량의 시료에서 지질 함량을 일차적으로 비교할 수 있는 방법으로 정확한 GC를 이용한 정량적인 분석을 수행하였다. 상기 실시예에서 얻은 감마선을 조사한 후 얻어진 클라미도모나스 레인하르티 M4013(*Chlamydomonas reinhardtii* M4013)와 방사선을 조사하지 않은 클라미도모나스 레인하르티 (*Chlamydomonas reinhardtii*)를 온도 20℃, 광도 50 mol photons m⁻² S⁻¹, 광주기 12L:12D 조건에서 3주간 배양하면서 지질 함량을 분석하였다.
- [0060] 지질 추출 방법은 동결 건조된 미세조류를 chloroform:methanol(2:1, v/v)에서 추출한 후 1M KOH가 녹아있는 Ethanol 용액 5ml로 반응 후 헥산(hexane):에틸에테르(ethylether)(1:1, v/v)로 층분리를 하여 5% H₂SO₄가 녹아있는 methanol 1mL을 첨가하고 90℃에서 90분 동안 반응시킨 뒤 0.9% NaCl 1.5mL을 넣고 헥산(hexane) 3mL으로 2회 추출 후 메틸렌클로라이드(methylenechloride) 1mL에 녹여 시료를 준비하였다.
- [0061] GC 분석조건은 SP2330 column(30m × 0.32mm × 0.2μm), 초기 온도(initial temperature) 130℃에서 2분, 최종 온도(final temperature) 230℃에서 20분, 분당 5℃, 인젝터 온도(injector temperature) 250℃, 인터페이스 온도(interface temperature) 250℃, 캐리어 가스(carrier gas)는 99.999% 헬륨(helium)으로 1.1 mL/min, 스플리트 비(split ratio) 45로 하였다.
- [0062] 도 2에서처럼 방사선을 조사하지 않은 클라미도모나스 레인하르티(*Chlamydomonas reinhardtii*)는 약 16%의 지질 함량을 가졌으나, 방사선 조사 후 얻어진 돌연변이 클라미도모나스 레인하르티 M4013(*Chlamydomonas reinhardtii* M4013)의 지질 함량은 약 22%를 나타내어 방사선을 조사하지 않은 클라미도모나스 레인하르티 (*Chlamydomonas reinhardtii*) 것에 비해 지질 함량이 약 37%의 증가가 확인되어졌다.

[0063] 이러한 결과로부터 본 발명의 클라미도모나스 레인하르티 M4013(기탁번호 : KCTC 18236P)는 방사선을 조사하지 않은 보통의 클라미도모나스 레인하르티(*Chlamydomonas reinhardtii*)에 비해 지질 생산능이 우수함을 알 수 있었다.

[0064] <실시예 3> 클라미도모나스 레인하르티 M4013(기탁번호 : KCTC 18236P)를 이용한 바이오 디젤의 제조

[0065] 상기의 실시예 2에서 얻은 클라미도모나스 레인하르티 M4013(기탁번호 : KCTC 18236P)를 하기와 같은 방법을 이용하여 바이오 디젤을 제조하였다.

[0066] 상기의 실시예 1에서 얻은 클라미도모나스 레인하르티 M4013(기탁번호 : KCTC 18236P)를 상기 실시예 1에 기재된 Modified bold's Basal medium 배지에 넣은 다음 광도 20 μmol photon m⁻²s⁻¹, 12:12 Light:Dark cycle, 온도 20℃를 유지하여 14일 동안 배양하였다.

[0067] 배양이 끝난 클라미도모나스 레인하르티 M4013 100리터(ℓ)를 6000rpm, 10분 동안 원심분리하여 배양액을 제거한 후 -70℃에서 24시간 동결건조시켰다.

[0068] 동결 건조된 클라미도모나스 레인하르티 M4013 15g를 5리터(ℓ)의 용매(Chloroform:methanol=2:1, v/v)에 첨가하여 25℃에서 1 시간 동안 추출한 후 10℃에서 8000rpm으로 10분 동안 원심분리하였다. 원심분리 후 얻은 클로로포름(Chloroform)층을 질소 농축하여 클로로포름(Chloroform)과 메탄올(methanol)을 제거하여 클라미도모나스 레인하르티 M4013로부터 지질을 분리하였다.

[0069] 상기의 클라미도모나스 레인하르티 M4013에서 얻은 지질을 1M KOH가 녹아있는 Ethanol 용액 5리터(ℓ)로 비누화 반응(saponification)을 시킨 다음 헥산:에틸에테르(hexane:ethylether=1:1, v/v)으로 층 분리하였다. 분리된 헥산:에틸에테르 층을 메틸레이션(methylation)을 수행하였다. 이때 메틸레이션(methylation)은 5% H₂SO₄가 녹아 있는 methanol 1리터(ℓ)를 첨가하고 90℃에서 90분간 반응시킨 후 0.9% NaCl 1.5리터(ℓ)를 첨가한 다음 헥산(Hexane) 3리터(ℓ)로 3회 추출하였다.

[0070] 추출된 헥산(hexane)층을 질소 농축하여 바이오 디젤을 생산하였다. 바이오 디젤은 GC를 이용한 성분분석으로 확인하였다.

[0071] <비교예1> 세네데스무스 디로르푸스 6G(Scenedesmus dimorphus 6G, 기탁번호 : KCTC 11880BP)의 지질함량 평가

[0072] 상기 실시예2의 방법으로 수행하되, 실시예1의 클라미도모나스 레인하르티 M4013 대신에 감마선을 조사하여 제조된 세네데스무스 디로르푸스 6G를 온도 20℃, 광도 50 mol photons m⁻² S⁻¹, 광주기 12L:12D 조건에서 3주간 배양하면서 성장물을 분석하였다. 성장물은 광학밀도 값으로 확인하였으며, 실시예2의 클라미도모나스 레인하르티 M4013의 광학밀도 값과 비교하여 그 결과를 표 1에 기재하였다. 또한 광학밀도 값을 그래프화 하여 도 3에 도시하였다. 본 발명에 따른 클라미도모나스 레인하르티 M4013는 세네데스무스 디로르푸스 6G보다 성장물이 30% 이상 높음을 확인하였다.

[0073] [표 1]

	광학밀도(750nm)	
	Chlamydomonas	Scenedesmus
0	0.01	0.01
1 주	0.08	0.04
2 주	0.11	0.08
3 주	0.14	0.1

[0074]

[0075] 상술한 바와 같이, 본 발명의 바람직한 실시예 및 비교예를 참조하여 설명하였지만 해당 기술 분야의 숙련된 당업자라면 하기의 특허청구범위에 기재된 본 발명의 사상 및 영역으로부터 벗어나지 않는 범위 내에서 본 발명을 다양하게 수정 및 변경시킬 수 있음을 이해할 수 있을 것이다.

수탁번호

[0076]

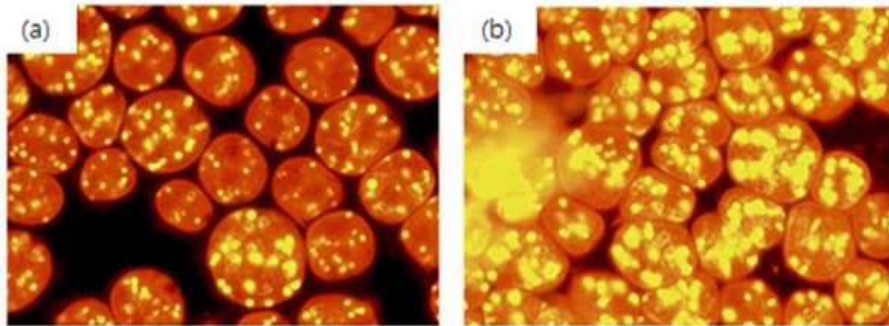
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC18236P

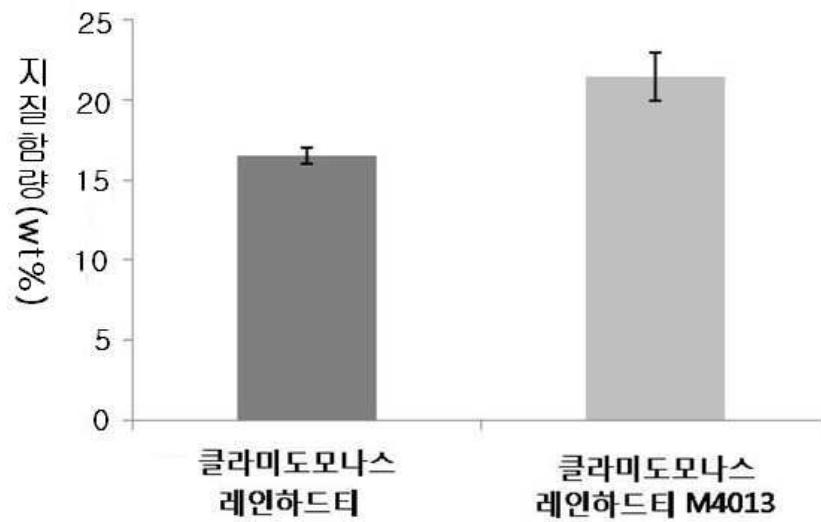
수탁일자 : 20130122

도면

도면1



도면2



도면3

