



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0040052  
(43) 공개일자 2010년04월19일

(51) Int. Cl.

C12S 3/18 (2006.01) C12P 7/14 (2006.01)

C10G 3/00 (2006.01) C10L 1/30 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0099099

(22) 출원일자 2008년10월09일

심사청구일자 2008년10월09일

(71) 출원인

지에스칼텍스 주식회사

서울시 강남구 역삼동 679

(72) 발명자

정광섭

대전시 유성구 전민동 462-5 세종아파트 103동 1506호

김재현

대전시 유성구 전민동 462-5 세종아파트 102동 1006호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인무한

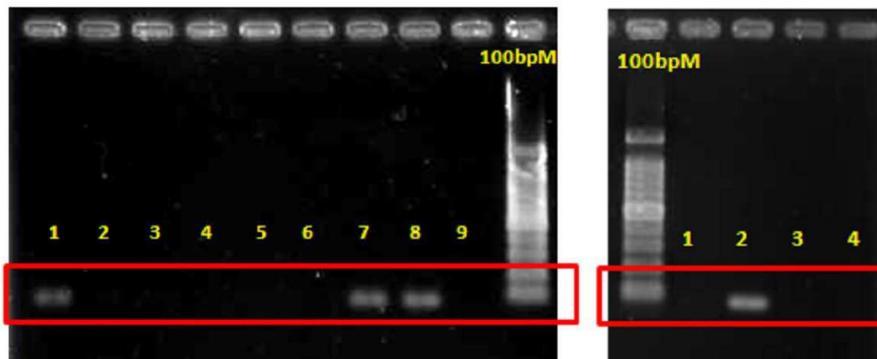
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 바이오 연료의 제조 방법, 클로스트리듐 아세트부틸리쿰에 대한 특이 프라이머 및 프로브

(57) 요약

바이오 연료의 제조 방법, 클로스트리듐 아세트부틸리쿰에 대한 특이 프라이머 및 프로브가 개시된다. 바이오 연료의 제조 방법은 바이오 연료 생산 미생물을 이용하는 미생물 발효에 의하여 바이오매스로부터 바이오 연료를 생산하기 위한 바이오 연료의 제조 방법에 있어서, 미생물 발효중인 시료를 채취하는 단계; 및 채취된 시료내 바이오 연료 생산 미생물 및 그 미생물의 변성(degeneration) 정도를 정량하는 단계를 포함한다.

대표도 - 도1



(A)

(B)

(72) 발명자

**엄문호**

서울시 마포구 신수동 457번지 벽산솔렌스힐 101동  
702호

**이율리아**

경기도 용인시 처인구 양지면 송문리 68번지

**상병인**

서울시 성북구 하월곡동 39-1 KIST 과학자 아파트  
A동 201호

**엄영순**

서울시 성북구 하월곡동 39-1 KIST 과학자 아파트  
B동 301호

**이선미**

서울시 동작구 사당동 대림아파트 5동 1301호

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

바이오 연료 생산 미생물을 이용하는 미생물 발효에 의하여 바이오매스로부터 바이오 연료를 생산하기 위한 바이오 연료의 제조 방법에 있어서,

상기 미생물 발효중인 시료를 채취하는 단계; 및

상기 채취된 시료내 바이오 연료 생산 미생물의 변성(degeneration) 정도를 정량하는 단계를 포함하는 바이오 연료의 제조 방법.

### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 정량 단계는,

실시간 중합효소 연쇄반응을 이용하여 상기 변성된 바이오 연료 생산 미생물을 정량하는 단계를 포함하는 바이오 연료의 제조 방법.

### 청구항 3

제2항에 있어서,

상기 바이오 연료 생산 미생물은 클로스트리디아(Clostridia) 속 미생물인 것을 특징으로 하는 바이오 연료의 제조 방법.

### 청구항 4

제3항에 있어서,

상기 클로스트리디아 속 미생물은 클로스트리듐 아세토부틸리쿰(*Clostridium acetobutylicum*)인 것을 특징으로 하는 바이오 연료의 제조 방법.

### 청구항 5

제4항에 있어서,

상기 실시간 중합효소 연쇄반응을 이용하여 상기 변성된 바이오 연료 생산 미생물을 정량하는 단계는,

상기 클로스트리듐 아세토부틸리쿰을 정량하는 단계; 및

상기 클로스트리듐 아세토부틸리쿰의 pSOL1 플라스미드를 정량하는 단계를 포함하는 바이오 연료의 제조 방법.

### 청구항 6

제5항에 있어서,

상기 클로스트리듐 아세토부틸리쿰을 정량하는 단계는,

상기 클로스트리듐 아세토부틸리쿰, 서열번호 1 및 2로 표시되는 염기서열을 가지며 상기 클로스트리듐 아세토부틸리쿰의 16s rDNA에 특이적인 제1 프라이머쌍 및 서열번호 5로 표시되는 염기서열을 가지는 제1 프로브를 포함하는 제1 혼합물을 준비하는 단계를 포함하고,

를 포함하고,

상기 클로스트리듐 아세토부틸리쿰의 pSOL1 플라스미드를 정량하는 단계는,

상기 클로스트리듐 아세토부틸리쿰, 서열번호 3 및 4로 표시되는 염기서열을 가지며 상기 클로스트리듐 아세토부틸리쿰의 pSOL1 플라스미드에 특이적인 제2 프라이머쌍 및 서열번호 6으로 표시되는 염기서열을 가지는 제2

프로브를 포함하는 제2 혼합물을 준비하는 단계를 포함하는 바이오 연료의 제조 방법.

**청구항 7**

제6항에 있어서,

상기 제1 혼합물의 제1 프로브의 5' 말단 및 상기 제2 혼합물의 제2 프로브의 5' 말단 각각에는 형광물질이 표지되어 있고,

상기 제1 혼합물의 제1 프로브의 3' 말단 및 상기 제2 혼합물의 제2 프로브의 3' 말단 각각에는 형광억제물질이 표지되어 있는 것을 특징으로 하는 바이오 연료의 제조 방법.

**청구항 8**

제7항에 있어서,

상기 클로스트리듐 아세토부틸리쿰을 정량하는 단계는,

상기 제1 혼합물을 실시간 중합효소 연쇄반응시키는 단계; 및

상기 제1 혼합물의 실시간 중합효소 연쇄반응시 발생하는 형광신호를 측정하는 단계를 더 포함하고,

상기 클로스트리듐 아세토부틸리쿰의 pSOL1 플라스미드를 정량하는 단계는,

상기 제2 혼합물을 실시간 중합효소 연쇄반응시키는 단계; 및

상기 제2 혼합물의 실시간 중합효소 연쇄반응시 발생하는 형광신호를 측정하는 단계를 더 포함하는 바이오 연료의 제조 방법.

**청구항 9**

제1항에 있어서,

상기 바이오 연료는 부탄올인 것을 특징으로 하는 바이오 연료의 제조 방법.

**청구항 10**

서열번호 1 및 2로 표시되는 염기서열을 가지며, 클로스트리듐 아세토부틸리쿰의 16s rDNA에 특이적이고, 바이오 연료 생산 미생물의 변성 정도를 정량하는 단계에서 사용되는 프라이머쌍.

**청구항 11**

제10항에 기재된 프라이머쌍과 함께 사용되며, 서열번호 3으로 표시되는 염기서열을 가지며, 바이오 연료 생산 미생물의 변성 정도를 정량하는 단계에서 사용되는 프로브.

**청구항 12**

서열번호 4 및 5로 표시되는 염기서열을 가지며, 클로스트리듐 아세토부틸리쿰의 pSOL1 플라스미드에 특이적이고, 바이오 연료 생산 미생물의 변성 정도를 정량하는 단계에서 사용되는 프라이머쌍.

**청구항 13**

제12항에 기재된 프라이머쌍과 함께 사용되며, 서열번호 6으로 표시되는 염기서열을 가지며, 바이오 연료 생산 미생물의 변성 정도를 정량하는 단계에서 사용되는 프로브.

**명세서**

**발명의 상세한 설명**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 화석 연료를 대체할 수 있는 대체 에너지원 제조에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 환경친화적인 바이오 연료의 제조 방법, 상기 바이오 연료 제조시 이용되는 클로스트리듐 아세트부틸리쿰에 대한 특이 프라이머 및 프로브에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002] 화석 연료로 대표되는 석유, 가스 및 석탄은 그 자원의 한정성으로 인하여 가격이 지속적으로 상승하고 있으며, 이의 원활한 확보를 위해 국가간 경쟁이 가열되고 있다. 더욱이, 상기 화석 연료로부터 생산되는 화학 제품들의 제조시, 그 부산물로서 지구 온난화 가스 및 폐기물이 대량 발생하므로, 지구 환경이 심각하게 오염되고 있다. 따라서, 상기 화석 연료를 대체할 수 있는 대체 에너지원이 필요한 실정이다.

[0003] 이에 따라, 최근 바이오매스(biomass)를 원료로 이용하여 환경친화적인 에너지원을 생산하는 기술이 개발되고 있다. 상기 바이오매스를 원료로 사용하고 생명공학 기술을 이용하여 바이오 연료(예, 에탄올, 부탄올 등의 알코올) 및 화학 원료(예, 젖산, 숙신산 등) 등을 만드는 기술과 이를 구현하기 위한 종합적인 플랜트 시스템을 바이오 리파이너리(bio-refinery)라 한다. 즉, 원유를 원료로 연료와 각종 화학 제품을 생산하는 오일 리파이너리(oil-refinery)가 종합적인 일관 공정(integrated process)으로 개발된 것처럼, 상기 바이오 리파이너리는 바이오매스를 원료로 이용하여 오일 리파이너리와 같은 개념으로 구축되는 통합 공정을 의미한다.

[0004] 상기 바이오 리파이너리는 크게 두 가지 경로, 즉, 열화학적 플랫폼 및 생화학적 플랫폼으로 구분될 수 있다.

[0005] 상기 열화학적 플랫폼은 합성가스 플랫폼(syngas platform)이라고도 하며, 상기 바이오매스를 고온, 고압에서 처리하여 수소, 일산화탄소 등 가스로 만든 후, 이를 각종 액체 연료와 화학 제품으로 전환하는 공정을 의미한다.

[0006] 이에 반해, 상기 생화학적 플랫폼은 당류 플랫폼(sugar platform)이라고도 불리며 상기 바이오매스로부터 유래된 당류를 바이오 연료 생산 미생물을 이용하여 발효시킴으로써 바이오 연료를 제조하는 데 초점을 맞추고 있다. 즉, 상기 생화학적 플랫폼에서는, 예를 들어, 클로스트리듐 아세트부틸리쿰(*Clostridium acetobutylicum*)으로 대표되는 부탄올 생산 미생물이 글루코오스와 같은 당분을 이용하여 일차적으로 아세트산, 부틸릭산 등과 같은 산을 생산(acidogenesis)한 다음, 상기 생산된 산을 재이용하여 부탄올, 에탄올 등과 같은 바이오 연료인 용매를 생산(solventogenesis)한다.

[0007] 그러나, 바이오 연료 생산 과정 중 상기 부탄올 생산 미생물이 산을 생산할 수 있는 상태에서 용매를 생산할 수 있는 상태로 전환되지 않아 상기 용매를 생산하지 못하는 현상이 발생할 수 있다. 이러한 현상을 바이오 연료 생산 미생물의 변성(degeneration)이라 한다. 상기 변성이 소정 정도 이상이면, 바이오 연료를 안정적으로 생산하기 어려우므로, 바이오 연료 생산 미생물의 변성 발생 정도를 모니터링하고, 이를 바탕으로 상기 변성을 방지할 수 있는 기술을 확보하는 것이 매우 중요하다.

**발명의 내용**

**해결하고자하는 과제**

[0008] 본 발명은 바이오 연료를 안정적으로 생산하기 위하여 변성된 바이오 연료 생산 미생물을 정량할 수 있는 바이오 연료의 제조 방법을 제공한다.

[0009] 본 발명은 부탄올을 안정적으로 생산하기 위하여 부탄올 생산 미생물의 일종인 클로스트리듐 아세트부틸리쿰, 상기 클로스트리듐 아세트부틸리쿰에 특이적인 프라이머 및 프로브의 혼합물의 실시간 중합효소 연쇄반응을 이용하여 변성된 클로스트리듐 아세트부틸리쿰을 실시간으로 정량할 수 있는 바이오 연료의 제조 방법을 제공한다.

[0010] 본 발명은 클로스트리듐 아세트부틸리쿰에 특이적인 프라이머 및 프로브를 제공한다.

[0011] 본 발명이 해결하고자 하는 또 다른 과제들은 이상에서 언급한 과제들로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

**과제 해결수단**

- [0012] 본 발명에 따른 바이오 연료의 제조 방법은 바이오 연료 생산 미생물을 이용하는 미생물 발효에 의하여 바이오 매스로부터 바이오 연료를 생산하기 위한 바이오 연료의 제조 방법에 있어서, 상기 미생물 발효중인 시료를 채취하는 단계; 및 상기 채취된 시료내 바이오 연료 생산 미생물의 변성(degeneration) 정도를 정량하는 단계를 포함한다.
- [0013] 여기서, 상기 정량 단계는, 실시간 중합효소 연쇄반응을 이용하여 상기 변성된 바이오 연료 생산 미생물을 정량하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0014] 여기서, 상기 바이오 연료 생산 미생물은 클로스트리디아(Clostridia) 속 미생물일 수 있다. 상기 클로스트리디아 속 미생물은 특별히 한정되지는 않으나, 예를 들어, 클로스트리듐 아세토부틸리쿰(*Clostridium acetobutylicum*)일 수 있다.
- [0015] 여기서, 상기 실시간 중합효소 연쇄반응을 이용하여 상기 변성된 바이오 연료 생산 미생물을 정량하는 단계는, 상기 클로스트리듐 아세토부틸리쿰을 정량하는 단계; 및 상기 클로스트리듐 아세토부틸리쿰의 pSOL1 플라스미드를 정량하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0016] 이때, 상기 클로스트리듐 아세토부틸리쿰을 정량하는 단계는, 상기 클로스트리듐 아세토부틸리쿰, 서열번호 1 및 2로 표시되는 염기서열을 가지며 상기 클로스트리듐 아세토부틸리쿰의 16s rDNA에 특이적인 제1 프라이머쌍 및 서열번호 5로 표시되는 염기서열을 가지는 제1 프로브를 포함하는 제1 혼합물을 준비하는 단계를 포함하고, 상기 클로스트리듐 아세토부틸리쿰의 pSOL1 플라스미드를 정량하는 단계는, 상기 클로스트리듐 아세토부틸리쿰, 서열번호 3 및 4로 표시되는 염기서열을 가지며 상기 클로스트리듐 아세토부틸리쿰의 pSOL1 플라스미드에 특이적인 제2 프라이머쌍 및 서열번호 6으로 표시되는 염기서열을 가지는 제2 프로브를 포함하는 제2 혼합물을 준비하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0017] 아울러, 상기 클로스트리듐 아세토부틸리쿰을 정량하는 단계는, 상기 제1 혼합물을 실시간 중합효소 연쇄반응시키는 단계; 및 상기 제1 혼합물의 실시간 중합효소 연쇄반응시 발생하는 형광신호를 측정하는 단계를 더 포함하고, 상기 클로스트리듐 아세토부틸리쿰의 pSOL1 플라스미드를 정량하는 단계는, 상기 제2 혼합물을 실시간 중합효소 연쇄반응시키는 단계; 및 상기 제2 혼합물의 실시간 중합효소 연쇄반응시 발생하는 형광신호를 측정하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0018] 상기 실시간 중합효소 연쇄반응시 형광신호를 발생시키기 위해 상기 제1 혼합물의 제1 프로브의 5' 말단 및 상기 제2 혼합물의 제2 프로브의 5' 말단 각각에는 형광물질이 표지되어 있고, 상기 제1 혼합물의 제1 프로브의 3' 말단 및 상기 제2 혼합물의 제2 프로브의 3' 말단 각각에는 형광억제물질이 표지되어 있다.
- [0019] 한편, 본 발명에 따른 프라이머쌍은 서열번호 1 및 2로 표시되는 염기서열을 가지며, 클로스트리듐 아세토부틸리쿰의 16s rDNA에 특이적이고, 바이오 연료 생산 미생물의 정량 및 그 미생물의 변성 정도를 정량하는 단계에서 사용된다.
- [0020] 한편, 본 발명에 따른 프로브는 클로스트리듐 아세토부틸리쿰의 16s rDNA에 특이적인 상기 프라이머쌍과 함께 사용되며, 서열번호 3으로 표시되는 염기서열을 가지며, 바이오 연료 생산 미생물의 정량 및 그 미생물의 변성 정도를 정량하는 단계에서 사용된다.
- [0021] 한편, 본 발명에 따른 프라이머쌍은 서열번호 4 및 5로 표시되는 염기서열을 가지며, 클로스트리듐 아세토부틸리쿰의 pSOL1 플라스미드에 특이적이고, 바이오 연료 생산 미생물의 변성 정도를 정량하는 단계에서 사용된다.
- [0022] 한편, 본 발명에 따른 프로브는 클로스트리듐 아세토부틸리쿰의 pSOL1 플라스미드에 특이적인 상기 프라이머쌍과 함께 사용되며, 서열번호 6으로 표시되는 염기서열을 가지며, 바이오 연료 생산 미생물의 변성 정도를 정량하는 단계에서 사용된다.

**효과**

- [0023] 본 발명에 따르면, 바이오 연료를 안정적으로 생산하기 위하여 변성된 바이오 연료 생산 미생물을 정량할 수 있다. 예를 들어, 클로스트리듐 아세토부틸리쿰(*Clostridium acetobutylicum*), 상기 클로스트리듐 아세토부틸리쿰에 특이적인 프라이머 및 프로브의 혼합물을 실시간 중합효소 연쇄반응시키고, 이때 발생하는 형광신호를 측정함으로써 변성된 클로스트리듐 아세토부틸리쿰을 실시간으로 정량할 수 있다.

[0024] 본 발명에 따르면, 실시간 중합효소 연쇄반응을 이용하여 변성된 바이오 연료 생산 미생물을 정량 분석할 수 있으므로, 그 선택성과 정확성이 높고, 실험방법이 간단하며 신속한 분석이 가능하다. 이를 통해, 바이오 연료 제조시 발생할 수 있는 바이오 연료 생산 미생물의 변성 현상을 조기에 감지하여 대처함으로써 안정적으로 바이오 연료를 생산할 수 있다.

[0025] 나아가, 본 발명은 바이오 연료가 미래 에너지원으로서 자리를 확보하는데 큰 기여를 할 수 있을 것이다.

**발명의 실시를 위한 구체적인 내용**

[0026] 이하, 본 발명에 따른 바이오 연료의 제조 방법, 클로스트리듐 아세토부틸리쿰에 대한 특이 프라이머 및 프로브에 대하여 상세히 설명한다.

[0027] 본 명세서에 있어서, “바이오매스”는 태양에너지를 받은 식물과 미생물의 광합성에 의해 생성되는 식물체, 및 이를 먹고 살아가는 동물체를 포함하는 생물/미생물 유기체를 포함하는 것으로서, 예를 들어, 각종 동식물을 비롯하여 농업에서 나온 부산물 및 폐기물, 음식물 쓰레기, 생체에 기초한 산업 폐기물, 바이오 연료 생산을 목적으로 재배된 작물 등을 포함할 수 있다. 특정 예로서, 상기 바이오매스는 사탕수수, 사탕무 등의 사탕류; 옥수수, 밀, 쌀, 카사바, 타피오카 등의 전분류; 및 목재 폐기물, 벧짚이나 옥수수대와 같은 농업 잔류물 등의 리그노셀룰로오스(lignocellulose) 중에서 적어도 하나일 수 있다.

[0028] 본 명세서에 있어서, “바이오 연료”는 생화학적 플랫폼을 통해 제조될 수 있는 연료를 말한다. 상기 바이오 연료는, 특별히 한정되지는 않지만, 예를 들어, 에탄올, 아세트, 부탄올 등과 같은 용매를 단독 또는 2종 이상을 포함할 수 있다.

[0029] 본 명세서에 있어서, “바이오 연료 생산 미생물”은 생화학적 플랫폼에서 상기 바이오매스로부터 유래된 당류 및/또는 카르복실산을 이용하여 바이오 연료인 용매를 생산(solventogenesis)할 수 있는 미생물을 말한다. 상기 바이오 연료 생산 미생물은 상기 당류 및/또는 카르복실산의 구체적인 종류 및 생산하고자 하는 바이오 연료의 구체적인 종류에 의해 달라질 수 있다. 따라서, 본 발명은 상기 바이오 연료 생산 미생물의 구체적인 종류에 의해 한정되지 않는다. 여기서, 상기 카르복실산은 상기 당류를 포함하는 당화액의 발효를 통해 생성될 수 있는데, 상기 당화액의 발효는 본 발명의 바이오 연료 생산 미생물에 의해 수행되거나, 또는 기존에 공지된 다른 미생물에 의해 수행될 수 있다. 상기 카르복실산은, 특별히 한정되지는 않으나, 예를 들어, 부틸릭산(butyric acid), 아세트산 등을 단독으로 또는 2종 이상을 포함할 수 있다.

[0030] 본 발명에 따른 바이오 연료의 제조 방법은 기존 생화학적 플랫폼 중에서 발생할 수 있는 바이오 연료 생산 미생물의 변성을 정량함으로써 바이오 연료를 안정적으로 생산하기 위해 제공되는 것으로서, 당업자는 상기 생화학적 플랫폼에 본 발명의 바이오 연료의 제조 방법을 용이하게 적용할 수 있을 것이다. 따라서, 이하에서는 본 발명에 따른 바이오 연료 생산 미생물의 변성을 정량하는 것에 대해 중점적으로 설명하도록 한다.

[0031] 본 발명에 따른 바이오 연료의 제조 방법은, 바이오 연료 생산 미생물을 이용하는 미생물 발효에 의하여 바이오매스로부터 바이오 연료를 생산하기 위한 바이오 연료의 제조 방법에 있어서, 상기 미생물 발효중인 시료를 채취하는 단계; 및 상기 채취된 시료내 바이오 연료 생산 미생물의 변성(degeneration) 정도를 정량하는 단계를 포함한다.

[0032] 상기 미생물 반응은 바이오 연료를 생산하기 위한 반응기 내에서 수행될 수 있다. 상기 반응기는 바이오 연료 생산 미생물을 연속배양하기 위한 것일 수 있으나, 이에 국한되지 않으며, 계대배양하기 위한 것이어도 무방하다.

[0033] 본 발명에 따른 바이오 연료 제조 방법을 통해 상기 바이오 연료 생산 미생물의 변성 정도가 소정 수준 이상이라고 판단되면, 작업자는 발효기에 변성되지 않은 바이오 연료 생산 미생물을 새로이 투입하거나, 또는 발효기 내의 바이오 연료 생산 미생물을 교체할 수 있다. 이 외에도, 작업자는 바이오 연료 생산 미생물의 변성 정도에 따라 바이오 연료를 안정적으로 생산하기 위한 다른 조치를 취할 수 있을 것이다.

[0034] 이하에서는, 본 발명에 따른 바이오 연료의 제조 방법에 대해 각 단계별로 구체적으로 설명한다.

[0035] 먼저, 바이오 연료 생산 미생물의 변성 정도를 정량하기 위해서는 미생물 발효중인 시료, 즉, 바이오 연료 생산 미생물을 포함하는 시료를 채취할 필요가 있다. 상기 시료의 채취는 일정한 주기마다 또는 필요시에 수행될 수 있다.

[0036] 여기서, 상기 바이오 연료 생산 미생물은 생산하고자 하는 바이오 연료의 종류에 따라 달라질 수 있으므로 특별

히 한정되지는 않으나, 예를 들어, 클로스트리디아(Clostridia) 속 미생물일 수 있다. 상기 클로스트리디아 속 미생물은 특별히 한정되지는 않으나, 예를 들어, 부탄올을 생산할 수 있는 클로스트리듐 아세토부틸리쿰 (*Clostridium acetobutylicum*), 클로스트리듐 베이어린키(*Clostridium beijerinckii*) 및 클로스트리듐 타이로 부틸리쿰(*Clostridium tyrobutyricum*)을 단독으로 또는 2종 이상 조합하여 사용할 수 있다. 이하에서는, 상기 클로스트리듐 아세토부틸리쿰 중에서 클로스트리듐 아세토부틸리쿰 ATCC 824를 예로 들어 설명한다.

[0037] 부탄올 생산 미생물로 광범위하게 사용되는 클로스트리듐 아세토부틸리쿰 ATCC 824의 경우, 용매를 생산 (solventogenesis)하는 과정시 용매를 생산할 수 있는 유전자그룹인 *ctfA*, *ctfB*, *adc*, *aad* 등을 포함하고 있는 210kb 크기의 pSOL1 플라스미드(plasmid)를 가지고 있다. 그런데, 상기 클로스트리듐 아세토부틸리쿰 ATCC 824가 변성될 경우, 상기 클로스트리듐 아세토부틸리쿰 ATCC 824는 상기 pSOL1 플라스미드를 잃게 되며, 그 결과 용매의 생산이 중단된다. 따라서, 변성된 클로스트리듐 아세토부틸리쿰 ATCC 824를 정량하기 위해 상기 클로스트리듐 아세토부틸리쿰 ATCC 824를 정량하고, 아울러 변성되지 않은 클로스트리듐 아세토부틸리쿰 ATCC 824이 가지고 있는 pSOL1 플라스미드를 정량할 수 있다.

[0038] 즉, 본 발명에 따른 바이오 연료 제조시, 변성된 바이오 연료 생산 미생물을 정량하는 위해서는 상기 클로스트리듐 아세토부틸리쿰을 정량하고, 아울러 상기 클로스트리듐 아세토부틸리쿰의 pSOL1 플라스미드를 정량할 수 있으며, 이때 변성된 바이오 연료 생산 미생물의 양은 상기 클로스트리듐 아세토부틸리쿰을 정량한 값에서 상기 클로스트리듐 아세토부틸리쿰의 pSOL1 플라스미드를 정량한 값을 뺀 값에 대응된다. 한편, 변성된 바이오 연료 생산 미생물을, 상술한 바와 같이, 간접적으로 정량하는 대신에 직접적으로 정량할 수도 있을 것이다.

[0039] 상기 클로스트리듐 아세토부틸리쿰을 정량하는 단계는 상기 클로스트리듐 아세토부틸리쿰과, 예를 들어, 하기 실시예의 표 1에 기재된 바와 같이, 서열번호 1 및 2로 표시되는 염기서열을 가지며 상기 클로스트리듐 아세토부틸리쿰의 16s rDNA에 특이적인 제1 프라이머쌍 및 서열번호 5로 표시되는 염기서열을 가지는 제1 프로브를 포함하는 제1 혼합물을 준비하는 단계를 포함할 수 있다. 또한, 상기 클로스트리듐 아세토부틸리쿰을 정량하는 단계는 상기 클로스트리듐 아세토부틸리쿰, 제1 프라이머쌍 및 제1 프로브를 포함하는 상기 제1 혼합물을 실시간 중합효소 연쇄반응시키는 단계, 및 상기 제1 혼합물의 실시간 중합효소 연쇄반응시 발생하는 형광신호를 측정하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0040] 아울러, 상기 클로스트리듐 아세토부틸리쿰의 pSOL1 플라스미드를 정량하는 단계는 상기 클로스트리듐 아세토부틸리쿰과, 예를 들어, 하기 실시예의 표 2에 기재된 바와 같이, 서열번호 3 및 4로 표시되는 염기서열을 가지며 상기 클로스트리듐 아세토부틸리쿰의 pSOL1 플라스미드에 특이적인 제2 프라이머쌍 및 서열번호 6으로 표시되는 염기서열을 가지는 제2 프로브를 포함하는 제2 혼합물을 준비 단계를 포함할 수 있다. 또한, 상기 클로스트리듐 아세토부틸리쿰의 pSOL1 플라스미드를 정량하는 단계는 상기 클로스트리듐 아세토부틸리쿰, 제2 프라이머쌍 및 제2 프로브를 포함하는 상기 제2 혼합물을 실시간 중합효소 연쇄반응시키는 단계, 및 상기 제2 혼합물의 실시간 중합효소 연쇄반응시 발생하는 형광신호를 측정하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0041] 이와 같이, 본 발명에서는 변성된 바이오 연료 생산 미생물을 정량하기 위한 정량적 검정 방법으로서, 예를 들어, 중합효소 연쇄반응의 반응 튜브 내 측정 수단으로 형광측정법을 이용하는 실시간 중합효소 연쇄반응(Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction: RT-qPCR)을 사용할 수 있다. 본 발명에 사용된 실시간 중합효소 연쇄반응은 대상 시료의 DNA 염기서열에 상보적인 프라이머 뿐만 아니라 프로브를 추가적으로 이용하기 때문에 선택성 면에서 탁월하다. 또한, 상기 실시간 중합효소 연쇄반응은 반응시간이 짧으며, 반응산물을 전기영동하여 확인하는 과정이 필요없기 때문에 간편성과 신속성 면에서 큰 장점을 가진다.

[0042] 일반적으로, 실시간 중합효소 연쇄반응을 이용한 모니터링은 형광시약을 이용한 형광검출이 사용되며, 이는 반응산물의 증폭과정에서 발생하는 형광신호를 검출하기 때문에 정확성이 높다는 장점이 있다. 본 발명에서는 프로브의 5' 말단에 형광물질을 표지하고 프로브의 3' 말단에 형광억제물질(Quencher)을 표지하여, 실시간 중합효소 연쇄반응이 진행될 때 5' 말단의 형광물질이 떨어지면서 발생하는 고유의 형광을 측정하는 방식을 이용한다. 상기 과정 중 프로브의 서열은 타겟의 고유한 염기서열로서, 특정 산물에만 붙으며, 실시간 중합효소 연쇄반응이 없으면 3' 말단의 형광억제물질에 의해 형광이 억제되고, 실시간 중합효소 연쇄반응이 많으면 비례적으로 형광의 양도 증가하므로 간접적인 정량 측정수단이 될 수 있다. 본 발명에서는 프로브의 5' 말단에 표지되는 형광물질로서 6-카르복시플루오레세인(6-carboxyfluorescein: 6-FAM)을 사용하고, 프로브의 3' 말단에 표지되는 형광억제물질로서 6-카르복시테트라메틸로다민(6-carboxytetramethylrhodamine: 6-TAMRA)을 사용한다. 그러나, 본 발명에서 사용되는 상기 형광물질 및 상기 형광억제물질은 상기한 바에 국한되지 않으며, 기타 공지된 형광물질 및 형광억제물질을 이용하여도 무방하다.

[0043] 이하에서는, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 하나, 후술되는 실시예에 의하여 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

[0044] [실시예]

[0045] 실시예

[0046] (1) 클로스트리듐 아세토부틸리쿰에 특이적인 프라이머 및 프로브 세트의 설계 및 제작

[0047] 클로스트리듐 아세토부틸리쿰의 16S rDNA의 염기서열은 공인된 데이터베이스에서 확보하였다(Keis, S. et al., Int. J. Syst. Bacteriol. 45 (4): 693-705, 1995). 이 염기서열을 기반으로하여 어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems)사의 프라이머 익스프레스(primer express) 라는 프로그램을 이용하여 각각 순방향 및 역방향 프라이머(제1 프라이머쌍), 및 제1 프로브를 설계하였다(하기 표 1 참조).

[0048] 제1 프로브의 5' 말단에는 형광물질인 6-카르복시테트라메틸로다민을 부착하였으며, 제1 프로브의 3' 말단에는 형광억제물질로서 6-카르복시테트라메틸로다민을 사용하였다.

표 1

타겟	서열번호	이름	서열 (5' → 3')
클로스트리듐 아세토부틸리쿰	서열번호 1	순방향 프라이머	GCCAAAGGATTTATTCGCTATGA
	서열번호 2	역방향 프라이머	GCCTTGGTGAGCCGTTACC
	서열번호 3	제1 프로브	ACCCGCGGCGCATTAGCTTGT

[0050] 클로스트리듐 아세토부틸리쿰에 대한 각 프라이머 및 프로브 세트의 특이성은 프로브 매치(Probe Match)라는 16S rDNA 데이터베이스에 있는 프로그램을 이용하여 이론적으로 검증하였다. 이후, 클로스트리디아(Clostridia)에 속하는 몇 가지 미생물을 배양하여 DNA를 추출한 후, 기제작된 프라이머를 이용하여 PCR 반응을 함으로서 실험적인 검증을 하였으며, PCR로 증폭한 결과를 도 1에 도시하였다. 도 1의 (A)에서 1은 클로스트리듐 아세토부틸리쿰(*Clostridium acetobutylicum*), 2는 클로스트리듐 타이로부틸리쿰(*Clostridium tyrobutyricum*), 3은 클로스트리듐 사카로퍼아세토니쿰(*Clostridium saccharoperacetonicum*), 4는 클로스트리듐 베이어린키(*Clostridium beijerinckii*), 5는 클로스트리듐 부틸리쿰(*Clostridium butyricum*), 6은 클로스트리듐 파스테우리아눔(*Clostridium pasteurianum*), 7은 변성된 돌연변이 1(mutant 1), 8은 변성된 돌연변이 2(mutant 2), 9는 음성대조구(negative control)를 나타내고, 도 1의 (B)에서 1은 클로스트리듐 부틸리쿰(*Clostridium butyricum*), 2는 클로스트리듐 아세토부틸리쿰(*Clostridium acetobutylicum*), 3은 클로스트리듐 디올리스(*Clostridium diolis*), 4는 음성대조구를 나타낸다.

[0051] 도 1을 참조하면, PCR 반응 결과 클로스트리듐 아세토부틸리쿰 및 변성된 돌연변이의 증폭 산물만 확인되었으며, 다른 종의 증폭 산물은 확인할 수 없었다. 따라서, 본 발명의 실시예를 통하여 제작된 프라이머 및 프로브 세트가 클로스트리듐 아세토부틸리쿰 및 변성된 돌연변이만을 선택적으로 검출할 수 있다는 것을 확인하였다.

[0052]

[0053] (2) 클로스트리듐 아세토부틸리쿰의 pSOL1 플라스미드에 특이적인 프라이머 및 프로브 세트의 설계 및 제작

[0054] 변성되지 않은 클로스트리듐 아세토부틸리쿰이 가지고 있는 pSOL1 플라스미드를 정량하기 위하여 pSOL1 플라스미드의 210kbp 염기서열 중 amyP 유전자에 해당하는 염기서열에 특이적으로 반응하는 순방향 및 역방향 프라이머(제2 프라이머쌍), 및 제2 프로브를 설계하였다(하기 표 2 참조).

[0055] 상기 AmyP 유전자는 α-아밀라아제(α-amylase) 효소의 발현에 관여하는 유전자로서 클로스트리듐 아세토부틸리쿰이 용매 생산 상태에 있을 때에만 발현되는 유전자이다(Sabathe, Croux et al. FEMS Microbiology Letters 210 (1): 93-98, 2002). pSOL1 플라스미드에 특이적인 프라이머 및 프로브의 설계는 클로스트리듐 아세토부틸리쿰에 특이적인 프라이머 및 프로브 세트의 설계와 동일한 방법으로 진행하였으며, pSOL1 플라스미드의 염기서열 역시 공인된 데이터베이스에서 확보하였다(Nolling, J. et al., J. Bacteriol. 183 (16): 4823-4838, 2001).

**표 2**

타겟	서열번호	이름	서열 (5' → 3')
pSOL1 플라스미드	서열번호 4	순방향 프라이머	CGAATTCTTCTGACTGGTGGCTAT
	서열번호 5	역방향 프라이머	TTTGAAATCATCGTAACTCCCAAGT
	서열번호 6	제2 프로브	CAGCCAACCAATCAAGCTATAGGAAATGCTC

[0056]

[0057]

[0058]

[0059]

[0060]

[0061]

[0062]

[0063]

상기 pSOL1 플라스미드에 대한 각 프라이머 및 프로브 세트의 특이성은 프로브 매치라는 16S rDNA 데이터베이스에 있는 프로그램을 이용하여 이론적으로 검증하였다. 이후, 변성된 클로스트리듐 아세토부틸리쿰인 변성된 돌연변이 M5(Cornillot, Nair et al. J. Bacteriol. **179** (17): 5442-5447, 1997)를 배양하여 DNA를 추출한 후 PCR 반응을 함으로서 실험적인 검증을 하였으며, PCR로 증폭한 결과를 도 2에 도시하였다. 도 2에서 1은 클로스트리듐 아세토부틸리쿰, 2는 변성된 돌연변이(M5), 3은 음성대조구를 나타낸다.

도 2를 참조하면, PCR 반응 결과 클로스트리듐 아세토부틸리쿰의 경우 증폭 산물을 확인할 수 있었지만, 변성된 돌연변이의 경우 증폭 산물을 확인할 수 없었다. 따라서, 본 발명의 실시예를 통하여 제작된 프라이머 및 프로브 세트가 클로스트리듐 아세토부틸리쿰이 가지고 있는 pSOL1 플라스미드를 선택적으로 검출할 수 있다는 것을 확인하였다.

**(3) 클로스트리듐 아세토부틸리쿰 및 pSOL1 플라스미드를 선택적으로 검출할 수 있는 프라이머 및 프로브 세트를 이용한 실시간 중합효소 연쇄반응**

본 발명의 실시예를 통해 제작된 프라이머 및 프로브 세트가 클로스트리듐 아세토부틸리쿰 및 pSOL1 플라스미드를 선택적으로 검출할 수 있는지 여부를 확인하기 위하여 실시간 중합효소 연쇄반응을 수행하였다. 상기 실시간 중합효소 연쇄반응은 96웰-플레이트(well-plate)에 1 $\mu$ l의 시료 DNA, 각각 900nM 순방향 및 역방향 프라이머, 250nM 형광프로브, 12.5 $\mu$ l의 2X Taqman universal PCR master mix를 넣은 후 최종 부피가 25 $\mu$ l가 되도록 멸균된 증류수를 첨가하였다. 모든 실시간 PCR 반응 조건은 50 $^{\circ}$ C에서 2분, 95 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시킨 후, 95 $^{\circ}$ C에서 15초, 60 $^{\circ}$ C에서 1분간 반응하는 단계를 45회에 걸쳐서 반복하였다. 반응에 따른 형광신호를 실시간으로 모니터링 한 결과 클로스트리듐 아세토부틸리쿰에 특이적인 프라이머 및 프로브 세트로는 클로스트리듐 아세토부틸리쿰 및 변성된 돌연변이(M5)가 선택적으로 증폭되어 검출되었으며(도 3 참조), pSOL1 플라스미드에 특이적인 프라이머 및 프로브 세트로는 pSOL1 플라스미드를 가지고 있는 클로스트리듐 아세토부틸리쿰만이 증폭되는 것을 확인할 수 있었다(도 4 참조). 한편, 반응 사이클 수가 증가함에 따라 클로스트리듐 아세토부틸리쿰 이외에 클로스트리듐 타이로부틸리쿰, 클로스트리듐 부틸리쿰 등의 형광신호가 증가하는 경향이 있으나, 이는 클로스트리듐 아세토부틸리쿰의 형광신호의 0.0001% 이하의 값으로 무시해도 될 만한 값으로 판단된다.

**(4) 상기에서 제작된 프라이머 및 프로브 세트를 각각 이용하여 클로스트리듐 아세토부틸리쿰 및 pSOL1 플라스미드 각각의 검량곡선 작성**

본 발명의 실시예를 통해 제작된 프라이머 및 프로브 세트를 이용하여 클로스트리듐 아세토부틸리쿰 및 pSOL1 플라스미드를 각각 정량 분석하기 위하여 표준시료를 일정 비율로 희석하여 실시간 중합효소 연쇄반응을 수행하는 과정을 통하여 검량곡선을 작성하였다. 구체적으로, 클로스트리듐 아세토부틸리쿰을 배양하여 DNA를 추출한 후, 프라이머 및 프로브 세트의 증폭 구간을 포함하도록 PCR을 수행하고 증폭산물을 정제한 후, TOPO 벡터(vector)에 삽입하여 표준시료로 만들었다. 이후, 피코그린(Picogreen)을 이용하여 표준시료의 농도를 측정하였으며, 표준시료를 일정비율(10배)로 희석하여 검량시료를 만들어 실시간 중합효소 연쇄반응을 수행하였다. 상기 실시간 중합효소 연쇄반응은 프라이머 및 프로브의 선택성 검증과정과 동일한 조건에서 수행되었다. 상기 실시간 중합효소 연쇄반응을 통하여 기준 형광 신호값에 도달하기 위한 PCR Cycle Number(Ct)값을 농도의 대수(log)값에 대하여 그래프를 작성하고 기울기와 절편을 계산하였으며, 그 그래프를 도 5에 도시하였다. 한편, 상기 pSOL1 플라스미드도 동일한 과정을 거쳐 검량곡선이 나타난 그래프를 작성하고 기울기와 절편을 계산하였으며, 그 그래프를 도 6에 도시하였다.

농도를 알고 있는 DNA의 카피(copy)로 전환하였을 시, 클로스트리듐 아세토부틸리쿰에 특이적인 프라이머 및 프

로브 세트는  $52.6 \sim 5.26 \times 10^7$  copies/ $\mu$ l 범위에서, pSOL1 플라스미드는  $110 \sim 1.1 \times 10^8$  copies/ $\mu$ l 범위에서 정량이 가능하였다.

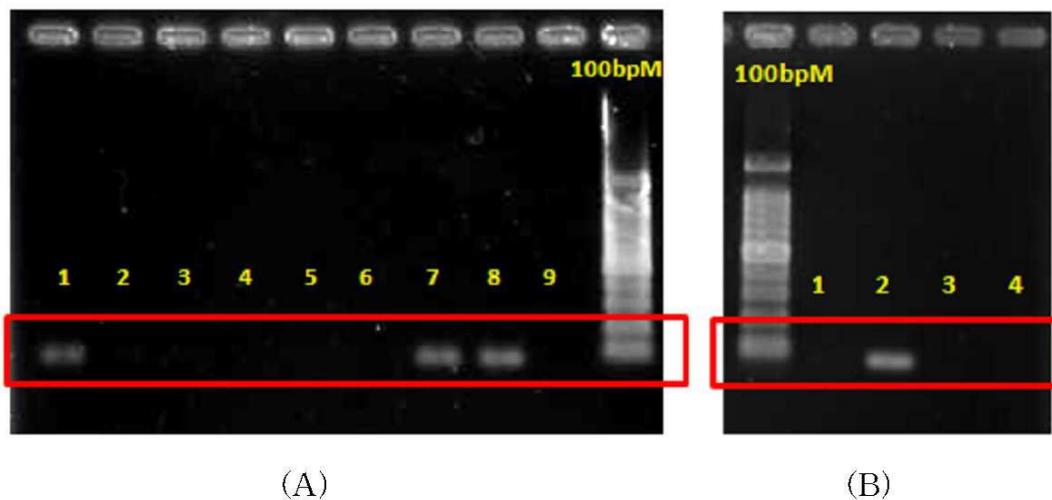
- [0064] 이상 첨부된 도면들을 참조하여 본 발명의 실시예를 설명하였지만, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다.
- [0065] 따라서, 이상에서 기술한 실시예들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이므로, 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 하며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

**도면의 간단한 설명**

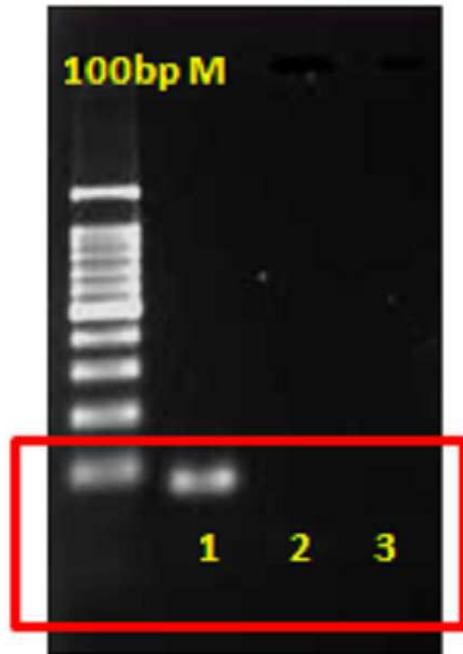
- [0066] 도 1은 클로스트리듐 아세토부틸리쿰에 특이적인 프라이머 및 프로브 세트의 특이성에 대해 실험적으로 검증하기 위해 클로스트리디아에 속하는 몇 가지 미생물의 DNA를 주형으로 하여 제작된 프라이머 및 프로브 세트를 이용하여 PCR로 증폭한 결과이다.
- [0067] 도 2는 클로스트리듐 아세토부틸리쿰의 pSOL1 플라스미드에 특이적인 프라이머 및 프로브 세트의 특이성에 대해 실험적으로 검증하기 위해 클로스트리디아에 속하는 몇 가지 미생물의 DNA를 주형으로 하여 제작된 프라이머 및 프로브 세트를 이용하여 PCR로 증폭한 결과이다.
- [0068] 도 3은 실시간 중합효소 연쇄반응을 이용하여 클로스트리듐 아세토부틸리쿰에 특이적인 프라이머 및 프로브 세트의 특이성에 대해 실험적으로 검증하기 위해 반응 사이클 수에 따른 Rn(response)값을 나타낸 그래프이다.
- [0069] 도 4는 실시간 중합효소 연쇄반응을 이용하여 pSOL1 플라스미드에 특이적인 프라이머 및 프로브 세트의 특이성에 대해 실험적 검증하기 위해 반응 사이클 수에 따른 Rn값을 나타낸 그래프이다.
- [0070] 도 5는 클로스트리듐 아세토부틸리쿰에 특이적인 프라이머 및 프로브 세트를 이용한 클로스트리듐 아세토부틸리쿰의 검량곡선을 나타낸 그래프이다.
- [0071] 도 6은 pSOL1 플라스미드에 특이적인 프라이머 및 프로브 세트를 이용한 pSOL1 플라스미드의 검량곡선을 나타낸 그래프이다.

**도면**

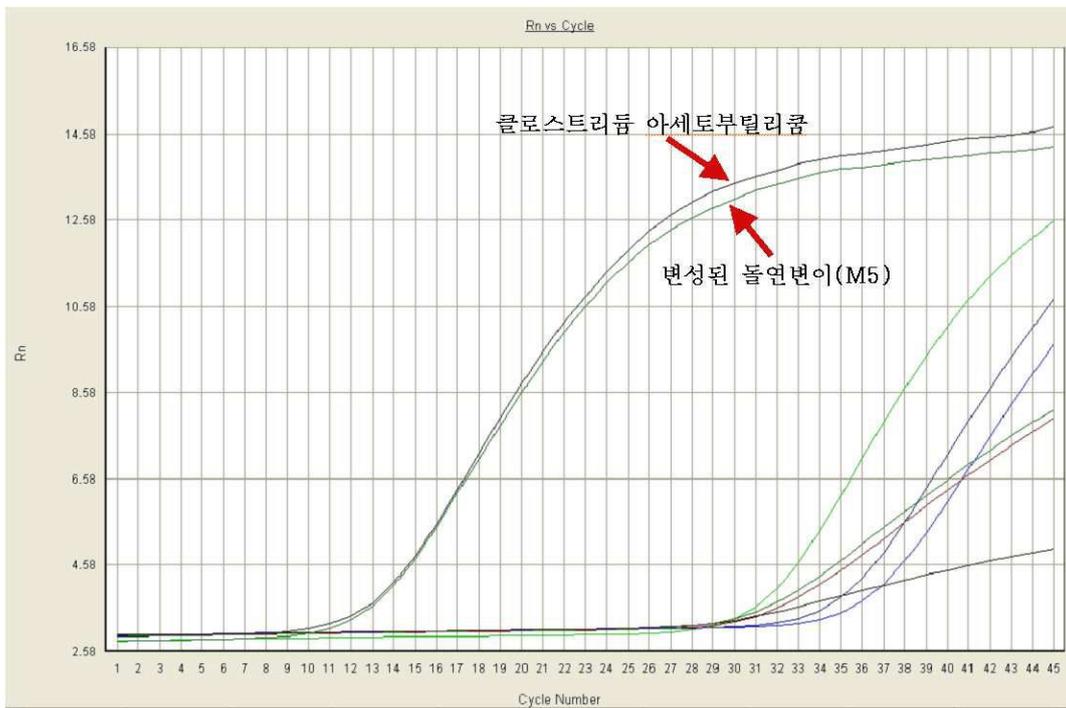
**도면1**



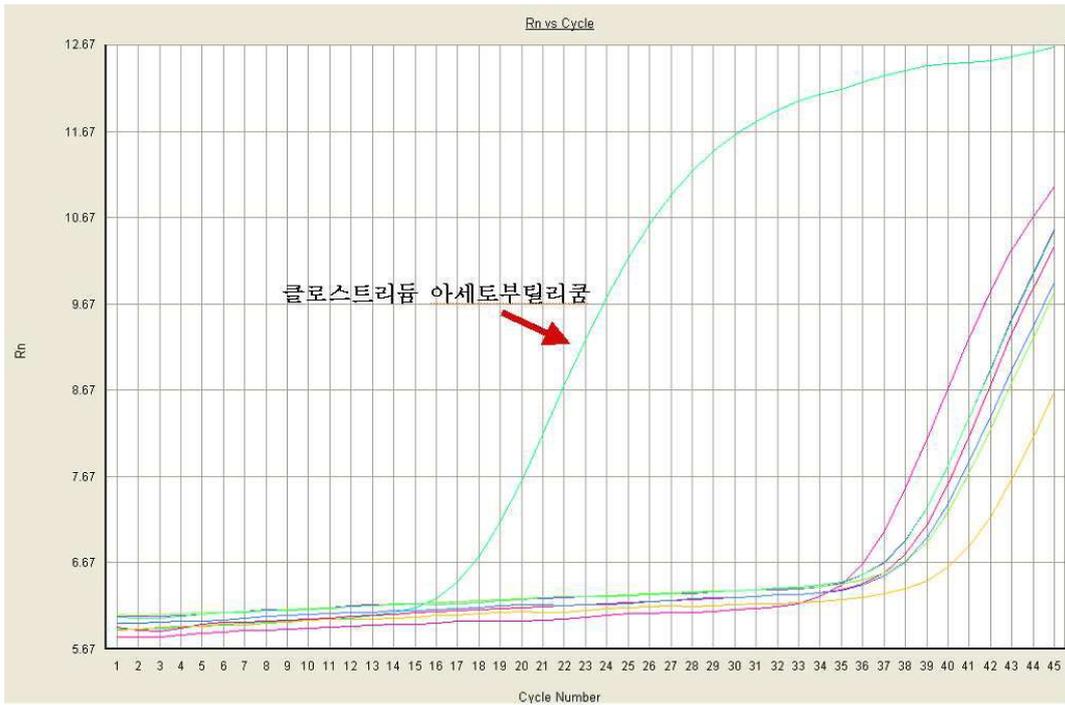
도면2



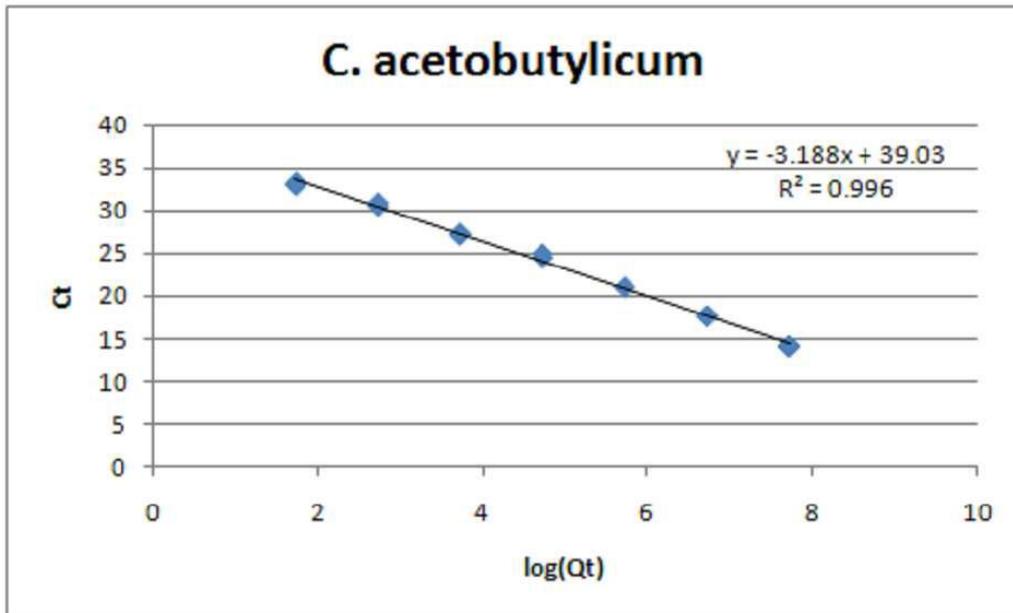
도면3



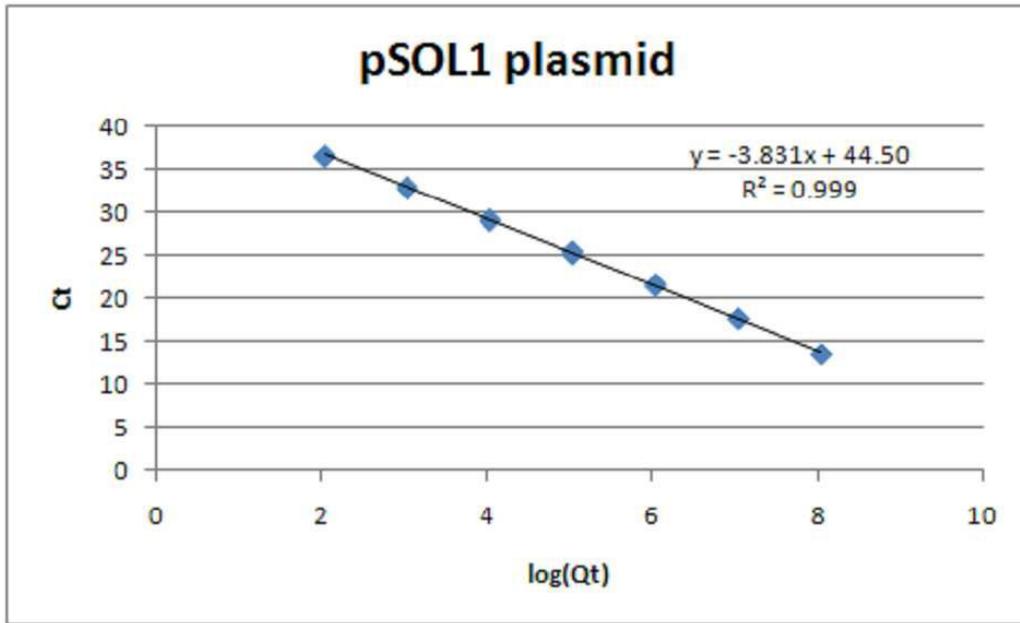
도면4



도면5



도면6



서열 목록

<110> GS CALTEX  
 <120> Method for manufacturning biofuel, specific primer and probe for Clostridium acetobutylicum

<160> 6

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Fprimer-16S rDNA

<400> 1  
 gccaaaggat ttattcgcta tga 23

<210> 2  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> R primer-16S rDNA

<400> 2

gccttggtga gccgttacc

19

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Prove-16s rDNA

<400> 3

accgcggcg cattagcttg t

21

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> F primer-pSOL1

<400> 4

cgaattcttc tgactggtgg ctat

24

<210> 5

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> R primer-pSOL1

<400> 5

tttgaaatca tcgtaactcc caagt

25

<210> 6

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Prove-pSOL1

<400> 6

cagccaacca atcaagctat aggaaatgct c

31