

# 바이오디젤 원료 작물 품종 개량과 생명공학기술 응용

노경희 · 박종석\*

농업생명공학연구원 분자생리과 대사물질연구실

## Biodiesel: Oil-crops and Biotechnology

Kyung Hee Roh and Jong-Sug Park\*

Plant Metabolic Engineering Lab, National Institute of Agricultural Biotechnology, RDA, Suwon 441-707, Korea

Received August 30, 2007; Accepted September 11, 2007

The substitution of fossil fuels with biofuels has been proposed by the European Union (EU) as part of a strategy to mitigate greenhouse gas emissions from road transport, increase security of energy supply and support the development of rural communities. Vegetable oils and their derivatives (especially methyl esters), commonly referred to as “biodiesel”, are prominent candidates as alternative diesel fuels. They have advanced from being purely experimental fuels to the initial stages of commercialization. They are technically competitive with or offer technical advantages compared to conventional diesel fuel. However, several problems remain including economics, combustions, some emissions, lube oil contamination, and low-temperature properties. Therefore, quality control of fuel-related properties of biodiesel is needed to obtain consistent engine performance by fuel users. The quality of the fuel is affected by the oil composition. Rapeseed oil has been targeted for fuel use because it produces an oil with a close-to-optimum set of fuel characteristics. In this paper we have reviewed past and current efforts, both by traditional seed-breeding methods and by genetic engineering, to modify rapeseed oil quality and yield.

**Key words:** Biodiesel, oil-crops, *Brassica napus*, cold stress, oleic acid

### 서 론

이산화탄소 발생량 증가 등으로 인한 지구 온난화가 가속화 되어짐에 따라 전 인류의 생존이 위협을 받고 있다. 기후변화에 관한 정부간 협의회(Intergovernmental Panel on Climate Change; IPCC)가 내놓은 보고서에 따르면 향후 100년간의 이산화탄소 가스 변화에 따라 기온은 섭씨 2-6도가 올라가고, 해수위는 최고 약 0.8미터까지 오를 것으로 추정하였다(Fig. 1). 또한 화석연료의 고갈이 예상되어지며 이에 대한 대체에너지로 신·재생에너지 개발이 절실하게 요구되고 있는 현실이며(Fig. 2) 지난 20년간 화석연료를 대체할 천연가스(Compressed natural gas; CNG), 액화석유가스(Liquefied petroleum gas; LPG) 등 몇몇 자원들이 등장 하였다. 이러한 대체연료들은 석유를 능가하는 경제적 장점이 있다는 특징을 가지고 있음에도 불구하고, 기존 수송용 차량의 엔진 교체 및 관련 인프라산업에 소요되는 많은 비용 등으로 시장의 주목을 끄는데 한계가 있다.

바이오연료는 자연계에 있는 바이오매스(Biomass)로부터 만들어진 지속가능한 에너지를 말한다. 바이오연료의 대표적인 예로는 바이오에탄올(Bioethanol), 바이오디젤(Biodiesel), 바이오가스, 기타 고형 연료 등을 들 수 있다. 바이오연료는 전력 생산이나 수송수단의 연료로도 사용될 수 있지만, 이동이 가능하다는 장점과 환경 특성을 고려해 수송용 연료를 중심으로 상업화가 가장 활발하게 진행되고 있다. 현재 바이오에탄올은 옥수수, 사탕수수 등의 전분을 발효하여 만드는 게 대부분이며, 바이오디젤은 콩과 유채의 종자유로부터 추출하는 것이 주종을 이루고 있다. 이들 연료는 기존 화석연료에 비해 효율이 크게 떨어지지 않고 환경친화적인 특성을 가지고 있으며, 기존 연료 인프라를 거의 그대로 사용할 수 있어 대체에너지원으로서 이상적인 것으로 평가받고 있다. 또한 바이오연료는 화석연료인 경우에 비하여 다음과 같은 장점을 가지고 있다: (i) 재생특성을 갖는 바이오매스로부터 생산되므로 에너지 자원의 고갈 문제가 없으며 (ii) 차량 연료로 사용할 때 발생하는 CO<sub>2</sub>는 작물 성장과정에서 회수되므로 CO<sub>2</sub>의 배출량이 대단히 적고 (iii) 바이오디젤에는 황이 포함되어 있지 않으므로 산성비의 주 요인인 SO<sub>x</sub> 배출이 거의 없고 (iv) 발암물질로 지목된 미세분진의 발생량이 대단히 적다.<sup>1)</sup> 유지작물의 식물성 기름이 바이오디젤로 이용되기 위해서는 몇가지 조건을 갖추어야 하는 데, 이중

\*Corresponding author  
Phone: +82-31-299-1729; Fax: +82-31-299-1722  
E-mail: jongsug@rda.go.kr

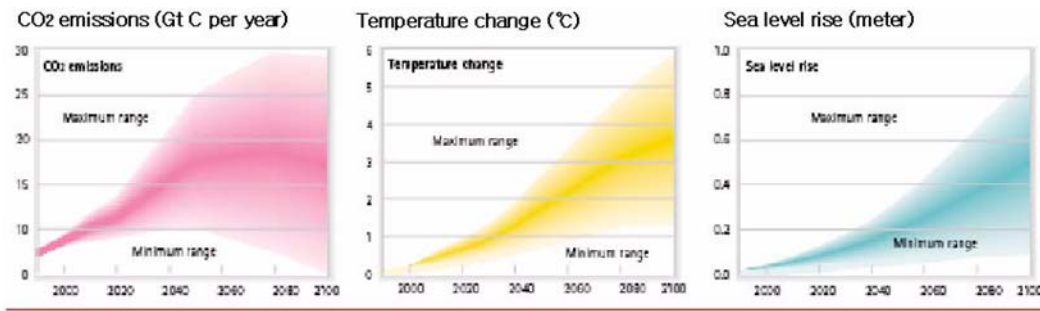


Fig. 1. Projected effects of emissions on temperature and sea levels (Source: IPCC, 2001).

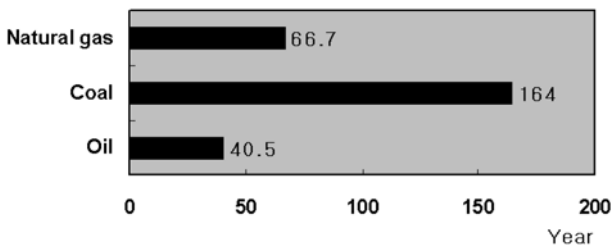


Fig. 2. Reverse-to-production (R/P) ratio of fossil fuels (Source: BP statistical Review of World Energy, 2005).

크게는 산화안정성이 높고 저온 필터 막힘 현상이 없어야 한다. 이러한 물성은 식물성 기름내의 지방산 조성 함량과 밀접한 관계가 있다.

본 총설에서는 식물성 기름으로부터 만들어지는 바이오디젤의 특성과 더불어 바이오디젤이 연료로 이용되는데 필요한 품질과 규격에 관한 일반적인 사항을 기술하였다. 또한 고품질 바이오디젤 생산을 위한 바이오디젤 원료작물의 품종 개발에 있어 생명공학 기술을 이용한 접근 전략을 소개하고자 하였다.

### 본 론

**바이오디젤의 생산.** 대부분의 식물성 기름은 디젤 엔진에 연료로 사용되어 질 수 있으며, 실제로 Rudolph Diesel 박사가 1900년도 파리 세계 박람회에서 작은 엔진을 달리게 하는데 땅콩기름을 사용하였다.<sup>2)</sup> 세계 최초로 개발된 ‘Diesel’ 엔진은 지금 사용하고 있는 ‘경유’가 아닌 식물성 기름을 넣고 달릴 수 있도록 고안된 것이었다. 그 당시에는 식물성 기름이 미네랄 오일보다 값이 싼데, 오일산업이 급속도로 발전하면서 마치 규격화된 미네랄 오일이 끊임없이 공급될 것처럼 보여 졌고, 결과적으로 미네랄 오일값이 식물성 기름 값보다 낮아지면서 미네랄 오일이 엔진연료 산업을 주도하게 되었다.

식물성 기름이 다시 관심을 끌게 된 것은 1970년대에 발생한 오일쇼크였다. 이로 인한 세계 경제 대공황의 위기 속에서 급속도로 소모되는 재생산되지 않는 화석연료의 소비와 더불어 그 결과로 지구 온난화를 초래하는 환경적 영향력이 문제로 제기되면서 재생산 될 수 있는 새로운 에너지 개발에 대한 관심이 모아졌다. 바이오연료 개발을 좀 더 촉진하게 된 계기는 미국과 유럽간 식량 과잉 생산을 중지하는 프로그램을 추진한데 있다. 미국에서는 처음으로 옥수수로부터 바이오에탄올을 개발

하였고, 지난 10년 전부터 대두유를 바이오디젤로 개발하는데 노력해 왔다. 유럽 또한 바이오디젤을 바이오연료로 선택해왔다.

옥수수유, 면화유, 대두유 및 유채유를 포함한 많은 종류의 식물성 기름이 디젤 엔진 원료로 사용하는데 적합하다. 그러나 예외적으로 이주까리 기름(Castor oil)은 점성이 너무 높아서, 그리고 아마유(Linseed oil)의 경우 산화안정성이 너무 낮아서 급속한 중합반응이 일어나는 등 연료로 사용하기에 부적합한 기름 조성을 가지고 있다. 유채유(Rapeseed oil)는 바이오디젤 연료용으로 가장 적합하다는 관심을 받아 왔는데, 그 이유는 디젤 연료 특성에 가장 가까운 기름 조성을 함유하고 있기 때문이다. 유채유는 현재 4가지 형태로 디젤연료로 사용되고 있다: (i) 순수한 유채유 (ii) 유채유와 디젤과의 혼합유 (iii) 유채유 메틸에스테르(RME; Rapeseed oil methyl ester) (iv) 유채유 메틸 에스테르와 디젤과 혼합유. 순수한 유채유는 어떠한 변형 및 첨가제 없이 압축점화엔진에 주입되어 사용되어진다. 이때 식물성 기름의 점성 및 고무화 되는 특성으로 인하여 연료분사장치에 연료가 분사되어질 때 큰 물방울이 생기게 되고, 이것으로 인하여 연료의 불연소화가 발생하게 된다. 이런 현상은 결과적으로 비효율적인 연료의 사용, 과도한 방출(High exhaust emissions), 과도한 탄소침전물(Excessive carbon deposits), 그리고 고무화되는 요인들이 집적되는 원인이 된다.

유채유를 기존 디젤과 혼합하여 사용할 경우 이러한 문제점을 극복할 수 있으나, 순수한 유채유가 연료로 사용될 경우 기대할 수 있는 환경적 장점이 무효화되어질 수 있다. 또한 혼합유를 만들고, 다루는 복잡성이 추가되어진다. 그렇지만, 화석연료 자급자족 국가의 경우는 혼합유를 더 선호하는 경향이 있다. 마지막으로 유채유는 메틸 에스테르로 변환되어져 지금의 디젤 연료로 사용되어 지고 있다. 유채유 메틸에스테르(RME)는 유럽내 바이오디젤 산업의 기반이 되고 있으며, 단독 또는 디젤과 혼합되어져 사용되어지고 있다.

바이오디젤(Biodiesel)이라는 명칭은 에스테르화(Transesterification)된 식물성 기름이 디젤 연료로서 사용된 것에서 비롯되었다. 에스테르화 과정은 1853년 E. Duffy와 J. Patrick에 의해서 개발되었다. 식물성 기름에 알콜(주로 메탄올)과 촉매제(염화나트륨 또는 수산화칼륨)를 넣고 섞으면, 에스테르와 글리세롤로 분리되는데 이때 분리되어져 나온 에스테르가 바이오디젤로 사용된다(Fig. 3).

**바이오디젤의 화학적·물리적 특성.** 바이오디젤의 원료가 되는 식물의 지방산은 종(Species)에 따라 그 조성이 다양하며

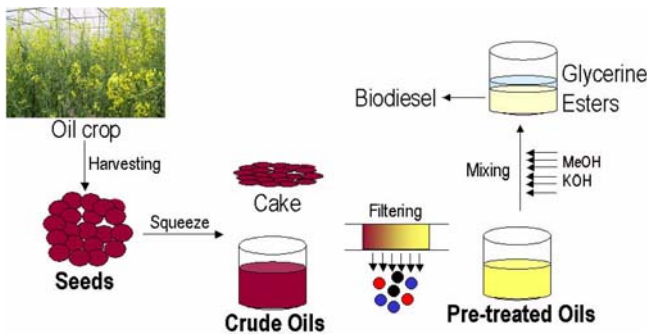


Fig. 3. The Biodiesel production process.

(Table 1)<sup>3)</sup> 이러한 다양성은 탄소사슬길이, 이중결합의 수, 이중결합의 위치와 배열에 따라 결정되어진다. 지방산은 크게 포화지방산(Saturated fatty acid; 이중결합이 없음) 과 불포화지방산(Unsaturated fatty acid; 이중결합이 있음) 으로 나뉜다(Table 2).<sup>3)</sup> 자연계에 존재하는 식물 지방은 글리세롤(Glycerol)의 세 에스테르 위치에 지방산이 결합되어 있는 트리글리세롤(Triacylglycerol)로 존재한다. 글리세롤의 제1탄소(*sn*-1-position)와 제3탄소(*sn*-3-position)의 위치에는 포화지방산이 위치하며, 제2탄소(*sn*-2-position)의 위치에 불포화지방산이 위치하는 것으로 알려져 있다.<sup>4)</sup> 포화지방산과 불포화지방산은 탄소사슬길이와 이중결합수에 따라 각 각의 화학적·물리적 특성이 결정되어진다. 따라서 식물 종마다 갖는 특이적 지방산 조성으로 인하여 종 특이적 기름의 물성(物性)이 다르고, 이로 인하여 바이오디젤의 물성(物性)이 결정되어 진다.

요오드화지수(Iodine value; IV)는 지질(lipid) 내의 불포화도의 척도로서, 지방 100g에 첨가되어지는 요오드(Iodine)의 그램 수로 나타낸다.<sup>5)</sup> 이것은 불포화된 탄소간 결합이 할로겐족(여

기서는 요오드를 가리킴)과 반응하는 능력을 측정하는 것으로서, 불포화된 지방산의 농도를 측정하는 유용한 지수이다. 따라서 포화지방산의 경우 요오드화지수가 0값을 가지며, 불포화지방산의 경우 이중결합 수에 따라 요오드화지수가 결정된다(Table 3).

산화안정성(Oxidative stability)은 지질내의 자가산화(Auto-oxidation)가 일어나는 정도를 나타내는 척도로서, 음식물의 산패원인이 되는 주요한 원인이 된다. 지질 산성화는 lipoygenase라는 효소에 의하여 자가산화과정(Auto-oxidation), 전파과정(Propagation), 종결과정(Termination)을 거쳐 발생한다.<sup>6)</sup> 지질내 자가산화과정은 다가불포화지방산(Polyunsaturated fatty acid; PUFAs) 내에 있는 메틸렌(Methylene)으로 연결되어 있는 이중결합을 포함하고 있는 지방산에서 퍼옥실자유기(Peroxy free radical) 등과 같은 자유기(Free radical)가 유리되어 나오면서 결과적으로 황폐화하는 효과를 가지는 연쇄 반응이다. 따라서 linolenic acid(18:3)가 linoleic acid(18:2)보다 산소와의 반응이 더 잘 일어나고, oleic acid(18:1)는 불포화지방산 중 상대적으로 산화안정성이 높다. 또한 산화안정성이 높은 포화지방산에 있어 cis-isomer가 trans-isomer보다 산화안정성이 낮은 특성을 갖는다. 식물내 지방산 조성 함량에 따른 산화안정성을 비교하면 Fig. 4와 같다.<sup>7)</sup> 지질내 산화안정성을 검정하기 위해 이차지질 산화물을 측정하는 Thiobarbituric acid(TBA) 검정법 및 산성화된 식물성 기름내에 있는 카르보닐화합물을 측정하여 나타내는 Anisidine value 등이 있다.<sup>8)</sup>

식물성 기름의 비중(Relative density)은 물보다 낮다. 일반적으로 기름의 비중은 분자량이 클수록 감소하고, 불포화도가 높을수록 증가한다. 또한 온도에 따라 비중이 달라지는데, 섭씨 1도가 증가할 때 비중은 0.64 kg/m<sup>3</sup>씩 감소한다.<sup>9)</sup> 점성(Viscosity)은 유체의 움직임에 대한 저항을 의미하는 것으로서 분자간 내

Table 1. The fatty acid composition of some vegetable oils<sup>1)</sup> (g per 100 g of total fatty acids)

	8:0	10:0	12:0	14:0	16:0	18:0	18:1 n-9	18:2 n-6	18:3 n-3	20:1+22:1	Total
Coconut (3.4) <sup>1)</sup>	8	7	48	18	9	3	6	2			99
Corn (1.9)					13	3	31	52	1		100
Cottonseed (4.0)				1	24	3	19	53			100
Groundnut <sup>2)</sup> (4.2)					13	3	37	41		2	96
Olive (2.7)					10	2	78	7	1		98
Palm (17.6)				1	43	4	41	10			99
Palm kernel (2.2)	4	4	45	18	9	3	15	2			100
Rape (Canola) (11.8)					4	2	56	26	10	2	100
Rape (high erucic)					3	1	16	14	10	55	99
Sesame (0.8)					9	6	38	45	1	1	100
Soybean (20.8)					11	4	22	53	8	1	99
Sunflower (9.3)					6	6	18	69			99
Castor <sup>3)</sup> (0.5)					1		3	4			98 <sup>b</sup>
Linseed (0.7)					6	3	17	14	60		100
Safflower (high oleic)					6	2	74	16			98
Safflower (high linoleic)					7	3	14	75			99

<sup>1)</sup>The numbers in parentheses after each crop name represent world production in 1997 in millions of tonnes.

Source: Gurr *et al.* (2002).

<sup>2)</sup>Also called peanut.

<sup>3)</sup>Castor oil contains 90% of ricinoleic acid.

**Table 2. Melting point depending on saturated and unsaturated fatty acids**

No. of carbon atoms	No. of double bond	Systematic name	Common name	Melting point (°C)
12	0	<i>n</i> -Dodecanoic	Lauric	42.2
14	0	<i>n</i> -Tetradecanoic	Myristic	52.1
16	0	<i>n</i> -Hexadecanoic	Palmitic	60.7
18	0	<i>n</i> -Octadecanoic	Stearic	69.6
20	0	<i>n</i> -Eicosanoic	Arachidic	75.4
22	0	<i>n</i> -Docosanoic	Behenic	80.0
24	0	<i>n</i> -Tetracosanoic	Lignoceric	84.2
26	0	<i>n</i> -Hexacosanoic	Cerotic	87.7
28	0	<i>n</i> -Octacosanoic	Montanic	90.9
16	1	<i>cis</i> -9-hexadecenoic	Palmitoleic	1
18	1	<i>cis</i> -9-octadecenoic	Oleic	16
20	1	<i>cis</i> -11-eicosenoic	Gondoic	24
22	1	<i>cis</i> -13-docosenoic	Erucic	24
18	2	<i>cis,cis</i> -9,12-octadeca dienoic	Linoleic	-5
18	3	All- <i>cis</i> -9,12,15-octadecatrihexadecatrienoic	$\alpha$ -Linolenic	-11
20	4	All- <i>cis</i> -5,8,11,14-eicosatetraenoic	Arachidonic	-49.5

**Table 3. Iodine values of selected unsaturated acids**

Fatty acid	Iodine value
16:1(n-9) <i>cis</i>	99
18:1(n-9) <i>cis</i>	89
18:2(n-6)	181
18:3(n-3)	273

부마찰력에 대한 간접적 척도이기도 하다. 탄소사슬길이가 길수록 점성은 높아지고, 불포화도와 온도가 높을수록 점성은 낮아진다.<sup>10)</sup>

포화지방산의 연소열(Heat of combustion)은 탄소길이가 길수록 증가되며, 불포화지방산의 연소열은 포화지방산보다 약간 낮은 편이다.<sup>9)</sup> 따라서 탄소길이가 긴 포화지방산일수록 기름내 높은 에너지를 내포하고 있다. 기름의 용점(Melting point)은 액체로 존재하는 온도를 의미한다. 일반적으로 포화지방산은 탄소사슬길이가 긴 결합력이 강하여 높은 용점을 가지며, 불포화지방산은 이중결합으로 인하여 탄소사슬이 꺾이는 부분(kick)이 있어 상대적으로 결합력이 느슨하여 낮은 용점을 가진다. 따라서 불포화지방산을 많이 함유한 식물의 기름의 경우 실온에서 액체로 존재한다.

**바이오디젤의 규격과 품질.** 바이오디젤이 자동차 연료로 사용됨에 있어 바이오디젤의 품질에 따라 자동차 엔진성능 저하 및 관련 부품 손상 가능성이 제기되어 오고 있는 실정이다. 실제로 바이오디젤을 연료로 사용한 자동차의 운행에 문제가 발생할 경우, 자동차 제작 회사와 바이오디젤 생산 회사간의 분쟁 발생 가능성이 높다. 이러한 문제를 해결하기 위해서는 바이오디젤의 국제적 규격이 요구되어진다. 20여년 전부터 유럽(특히, 독일중심)에서는 유채기름을 이용한 바이오디젤의 상용화가 이루어져왔으며, 바이오디젤 연료의 용도와 바이오디젤 함유량에 따라 연료유 규격이 마련되어 오고 있다.

식물성 기름은 지방산 메틸에스테르 또는 바이오디젤의 원료가 되며, 연료의 품질은 지방산 조성에 의해 결정되어진다. 바



**Fig. 4. Relative oxidative stability of some major vegetable oils.** Scale is based on inherent oxidative stability, calculated by multiplying the decimal fraction of each unsaturated fatty acid present in a lipid by its relative oxidation rate and then summing these (Erickson and List, 1985).

이오디젤 연료로 이상적인 지방산 조성은 포화도도 낮고, 불포화도도 낮아야 한다. 다시말하면 이를 만족하기 위해서는 이중결합이 한 개 있는 단일불포화지방산(Monounsaturated fatty acids)이 많아야 한다.

식물성 기름내에 포화지방산이 높으면 cloud point 또는 cold filter plugging point(CFPP)에 의해 측정되는 용점(Melting point)이 높은 경향을 나타낸다(Table 4). 포화지방산이 많은 기름들은 유동이 낮은 특성을 갖고 있어 낮은 온도에서는 고체(예: 팜유)화가 되기도 하나, 열대기후에서는 연료로 사용하기에 적합하다. 다가불포화지방산(요오드지수로 불포화도 반영)을 많이 함유하고 있는 기름은 산화성이 높아 중합반응이 일어난다. 이러한 특성을 가진 연료는 기름통내 두꺼운 침전물을 만들고, 이로인하여 실린더옆으로 기름이 새어서 내연기관의 크랭크실(Crankcase) 안으로 들어가는 현상이 발생한다.

원료인 식물성 기름의 품질은 생산되어지는 바이오디젤의 최종 생산물의 품질을 결정짓는 중요한 영향을 미친다. 바이오디젤의 성공을 결정짓는 중요한 요인은 엔진 제조회사들의 승인에 있어 왔다. 엔진 제조회사들은 바이오디젤의 연료로의 보증을 위해 바이오디젤 표준 규격을 요구해왔다.<sup>11)</sup> 바이오디젤 규격은 유럽의 CEN(European Committee for Standardization)에 의해 용도에 따라 자동차용과 난방용으로 구분하고, 바이오디젤이 96% 이상 연료로 사용되는 전용차량과 5% 미만을 연료로 사용하는 일반차량으로 구분하여 마련되어졌다(Table 5)([http://en.wikipedia.org/wiki/EN\\_14214](http://en.wikipedia.org/wiki/EN_14214)). 유럽에서는 바이오디젤 규격

**Table 4. Specifications of ENs (European Standards) approved by CEN (European Committee for Standardization) for the biodiesel standard. EN 14214 is standard of the pure Biodiesel for vehicles. EN 14213 is for heating. EN 590 is of BD 5 (blending up to 5% Biodiesel with 'conventional' diesel) for vehicles**

Property	EN 14214 ('03)	EN 14213 ('01)	EN 590 ('04)	Test method
Ester content, %(m/m)	>96.5	>96.5	<5	prEN 14103 <sup>a</sup>
Density at 15°C, (kg/m <sup>3</sup> )	860~900	860~900	820~845	EN ISO 3676, EN ISO 12185
Viscosity at 40°C, (mm <sup>2</sup> /s)	3.5~5.0	3.5~5.0	2.0~4.5	EN ISO 3104
Flash point, (°C)	>120	>101	>55	ISO/CD 3679 <sup>b</sup>
Sulfur content, (mg/kg) <sup>c</sup>	<10	-	<10 or <50	
Tar remnant (at 10% distillation remnant), %(m/m) <sup>d</sup>	<0.3	0.3	<0.3	EN ISO 10370
Cetane number	>51.0	-	>51.0	EN ISO 5165
Sulfated ash content, %(m/m)	<0.02	<0.01	-	ISO 3987
Water content (mg/kg)	<500	<500	<200	EN ISO 12937
Total contamination (mg/kg) <sup>e</sup>	<24	<24	<24	EN 12662
Copper band corrosion (3 hours at 50°C)	Class 1	-	Class 1	EN ISO 2160
Thermal stability <sup>f</sup>				
Oxidation stability (110°C, hours)	>6.0	-	-	prEN14112 <sup>g</sup>
Acid value (mg KOH/g)	<0.5	<0.5	-	prEN14104
Iodine value	<120	-	-	prEN14111
Linolenic acid Methyl ester, %(m/m)	<12	-	-	prEN14103 <sup>a</sup>
Polyunsaturated (>=4 Double bonds) Methyl ester, %(m/m) <sup>h</sup>	<1	-	-	
Methanol content, %(m/m)	<0.2	-	-	prEN 14110 <sup>h</sup>
Monoglyceride content, %(m/m)	<0.8	<0.8	-	prEN 14105 <sup>i</sup>
Diglyceride content, %(m/m)	<0.2	<0.2	-	prEN 14105 <sup>i</sup>
Triglyceride content, %(m/m)	<0.2	<0.2	-	prEN 14105 <sup>i</sup>
Free glycerine, %(m/m) <sup>d</sup>	<0.02	<0.2	-	prEN 14105 <sup>i</sup> , prEN 14106
Total glycerol, %(m/m)	<0.25	-	-	prEN 14105 <sup>i</sup>
Alkali metals (Na+K), (mg/kg) <sup>j</sup>	<5.0	-	-	prEN 14108, prEN 14109
Phosphorus content, (mg/kg)	<10	-	-	prEN 14107 <sup>k</sup>
Cold filter plugging point, (°C)	-20~5, -20~44 (arctic)	equal to Mineral oil	-20~5, -20~44 (arctic)	

<sup>a</sup>CEN/TC 307 publication of NF T 60-703: 1997.

<sup>b</sup>Apparatus equipped with a thermal detection device shall be used.

<sup>c</sup>Suitable test methods to be proposed by CEN/TC 19.

<sup>d</sup>ASTM D 1160 shall be used to obtain the 10% distillation residue.

<sup>e</sup>Pending development of a suitable method by CEN/TC 19, EN 12662 shall be used. The precision of EN 12662 is however poor for FAME products.

<sup>f</sup>Suitable test method and limit to be proposed by CEN/TC 19.

<sup>g</sup>CEN/TC 307 publication of ISO 6886 modified.

<sup>h</sup>CEN/TC 307 publication of NF T 60-701 (procedure A) and DIN 51608 (procedure B).

<sup>i</sup>CEN/TC 307 publication of NF T 60-704: 1997.

<sup>j</sup>Extension of this limit to cover additional elements, e.g. Ca and Mg to be considered.

<sup>k</sup>CEN/TC 307 publication of NF T 60-705: 1997.

<sup>l</sup>Suitable test method to be developed.

을 유채메틸에스테르(RME)에 맞게 조정하였다. 해바라기유와 대두유 메틸에스테르는 불포화도가 너무 높아 이 규격을 만족할 수 없어 바이오디젤 원료 기름으로는 부적합하다. 참고적으로 부적합한 연료를 사용하였을 경우 자동차 부품과 성능에 미치는 영향을 Table 6에 기술하였다.

**유채의 품종 개량 현황.** 유채(Rapeseed)와 카놀라(Canola)라고 일컬어지는 작물에는 *Brassica napus* L., *Brassica rapa* L. (이전에는 *Brassica campestris* L.) 그리고 *Brassica juncea* L 이 속한다.<sup>12)</sup> 이 중 *Brassica napus*와 *Brassica rapa*는 캐나다를 비롯하여 전 세계적으로 추파형(Winter-type)과 춘파형(Summer-type)으로 재배되며, *Brassica rapa*의 Sarson type은 인도에서 재배되어 지고 있다.

유채 기름에 있는 에루진산(Erucic acid, *cis*-22:1) 이 동물의 심장병을 유발시킬 수 있다는 부정적인 견해가 제기된 이래 캐

나다의 육종프로그램에 의해서 최초로 저 에루진산 유채품종 (Low erucic acid rapeseed; LEAR)이 1960년대에 개발되었다.<sup>13)</sup> 오늘날 유채 기름의 산업화 규격에는 에루진산 함량을 최고 1%로 제한하고 있다.<sup>14)</sup> 연구자들은 또한 글루코시놀레이트 (Glucosinolate) 함량을 낮추려고 시도하였다. 유채기름을 짜고 난 유채종자껍질(유채박)은 동물 사료로 이용된다. 그런데 유채 박에는 황(Sulfur)을 내포하고 있는 글루코시놀레이트라고 불리는 성분이 있고, 이 성분은 매운 겨자와 같은 맛을 내어 가축이 사료로 기피하는 현상이 있으며, 이 성분이 축적될 경우 가축의 간과 신장의 기형을 초래하고 더 나아가 불임의 원인으로 작용된다는 문제점이 제기되었다. 1970년대에 Bronowski 품종의 저 글루코시놀레이트 형질이 성공적으로 *B. napus*와 *B. rapa*에 도입되어졌다.

유채 육종의 도약적인 발전으로 유채 기름내 저 에루진산과

Table 5. Effects of limit transgression in the case of biodiesel

Property (DIN EN 14214)	Effect/ Comment
Kinematic viscosity at 40°C	Fuel conveyance problems(fuel pump, injection pump)
Flash point	A flash point of less than 100°C renders the product hazardous
CFPP(filtration limit)	Machine standstill through crystallization of fuel in the pipes and the fuel filter at low temperature
Residual coke	Coke deposits on the injection pump and position rings. Problematic in the case of FAME with a high content of multiple bonds or glycerine/glycerides
Ash content	Damage to exhaust-gas re-treatment systems
Water content	Corrosion problems, turbidity of DK/FAME mixtures (resulting in separation of the water phase in the worst case)
Total contamination	Machine standstill through filter backfill, potential consequential damage to the injection pump as a result of insufficient lubrication/ cooling by circulating fuel
Oxidation stability (induction period)	Filter backfill, precipitation of polymers in diesel/ biodiesel mixtures throughout the fuel supply system
Acid number	Corrosion problems
Glycerine and glycerides	Coke deposition on the injection pump and position rings; possible reason for increased coke residue
Iodine number	Indicates unfavourable fatty acid properties, deviations can affect oxidation stability and CFPP
Alkaline content (Na+K)	
Alkaline earth content (Ca+Mg)	Machine standstill through filter backfill; possible reason for increased ash content

Source: Bio-Diesel Quality Management Work Group

유채박내 저 글루코시놀레이트의 형질을 가진 소위 *double-low* 품종이 생산되었다. 1974년 캐나다에서 최초의 *double-low* 품종에 일종의 인증서와 같은 의미로 카놀라(Canola)로 명명하였다.<sup>15)</sup> 카놀라의 기름성분은 올레인산 함량이 약 60%이며, 포화지방산 함량이 약 6-7%로 영양학적인 관점에서 매우 긍정적인 평가를 받고 있다.

국내 유채 품종 개발은 농촌진흥청을 중심으로 고전육종을 통해 이루어져 왔다. 잡종강세를 이용하고자 웅성불임계통을 육성하였고, 웅성불임성을 이용하여 생산성이 획기적으로 증수된 (450 kg/10a) 1대잡종 품종(청풍, 선망, 청람)이 개발되어졌으며,<sup>16-18)</sup> 바이오디젤 품질을 결정짓는 올레인산 함량이 60-65%까지 증대된 고 올레인산 품종(용당, 한라, 영산, 내한, 탐라, 탐미 등)이 개발되었다.<sup>19)</sup>

**올레인산 함량 증진.** 앞에서 살펴본 바와 같이 바이오디젤 연료 규격을 만족하게 하기 위해서는 지방산 조성 중 올레인산 함량이 높아야 한다. 국내 개발 품종 중 올레인산 함량이 가장 높은 품종은 영산유채로 약 65%의 올레인산을 함유하고 있다. 이 정도의 올레인산 함량은 난방용 또는 디젤과 혼합한 형태로 자동차 연료로 사용가능하기도 하다. 그러나 금후 순수한 유채유를 연료로 사용하는 전용차량용 연료로 사용하기에는 아직 부족하다. 이를 개선하기 위한 실험이 활발히 진행 중에 있으며, 지금까지 개량된 유채 품종 중 고 올레인산 품종(High oleic acid; HO)은 화학적 돌연변이 선발육종에 의해 만들어졌으며, 올레인산 함량을 80%까지 증진되었다고 보고되었다.<sup>20,21)</sup>

올레인산 함량 증진을 위해서는 올레인산(18:1)이 리놀레산(18:2)으로 전환되는데 관여하는 oleic acid desaturase의 활성을 저하시킴으로써 가능해진다(Fig. 5). 이 효소는 두 종류의 이성질체(Isoform)로 존재한다. 한 종류는 세포질내에 있는 소포체(Endoplasmic reticulum; ER)에 존재하는 FAD2(Oleoyl-phosphatidylcholine  $\Delta$ 12-desaturase)이고, 다른 한 종류는 엽록체내에 존재하는 FAD6이다. 분자생물학적으로 이 유전자의 발현을 억제하는 Cosuppression/Antisense 기술을 이용한다면 성공적으로 올레인산 함량이 증대되어질 것으로 보인다. DeBonte

와 Hitz(1998)는 세포질내에 있는 FAD2 유전자의 발현을 억제시킴으로써 올레인산 함량이 86%인 카놀라 형질전환체를 보고한 바 있으며,<sup>22)</sup> Stoutjesdijk 등 도 이와 비슷한 결과를 얻었다.<sup>23)</sup> 특히 엽록체내에 존재하는 FAD6의 발현까지 억제한다면 올레인산 함량을 90%이상까지 증진될 거라 사료된다.

**포화지방산 함량 감소.** 포화지방산은 산화안정성은 높으나, 용점(Melting point)이 높다. 따라서 포화지방산이 많은 바이오디젤은 열대지방에서는 연료로 사용가능하나, 온대지방 또는 추운지방의 경우 포화지방산의 함량에 따라 상온에서도 고체화되어 연료로 사용하기가 부적합하다. 식물내 주로 존재하는 포화지방산은 팔미트산(Palmitic acid; 16:0)과 스테아르산(Stearic acid; 18:0)이다. 미국과 캐나다에서는 포화지방산 함량이 7.1% 미만인 것을 저 포화지방산으로 인정하고 있다. 캐나다의 Canola Council에서는 일차적인 목표치를 6% 미만으로 설정하고 있으며, 장기적으로는 3.5% 미만을 목표치로 설정하였다.<sup>24)</sup>

포화지방산에서 불포화지방산으로 전환되는데 관여하는 stearoyl-ACP desaturase( $\Delta$ 9-desaturase) 유전자를 과다발현 하였을 때 스테아르산이 감소되었다고 보고된 바 있다.<sup>25)</sup> 또한 쥐(Rat)의 stearoyl coenzyme A desaturase를 담배에서 발현시킨 결과, 포화지방산(16:0과 18:0) 함량이 감소하고, 단일불포화지방산(Monounsaturated fatty acid; MUFA) 함량이 증대되었다고 한다.<sup>26)</sup>

**기름함량 증진과 노란색 종피.** 기름함량 증진은 일반적으로 거의 모든 유지식물의 육종목표이기도 하다. 현재 재배되고 있는 유채의 기름함량은 35-45%에 해당된다. 유채에서 기름함량을 늘리기 위한 육종 프로그램 중 첫 단계로 노란종피(Yellow seed coat) 유채 품종 개발을 목표과제로 설정하고 있다.<sup>27)</sup> 현재 재배되고 있는 검은종피(Black seed coat) 유채와 비교할 경우 Brassica rapa 에 있는 노란종피색 종자를 살펴보면 상대적으로 종피가 얇고, 기름함량과 단백질함량이 높기 때문이다. 종피색이 검은 이유는 안토시아닌성분이 많아서인데, 검은 종피색 종자를 착육하였을 때 기름색이 검붉어 소비자들에게 혐오감을 불러일으킬 뿐만 아니라 바이오디젤 제조 회사들은 검붉은 색

**Table 6. Genetically engineered alterations in the cold stress and freezing tolerance of plants**

Functions of transformed genes	Host plants	Effects on the enhancement of temperature and other stress tolerances	Remarks	Refs
<b>Active oxygene species</b>				
Chloroplast CuZn-superoxide dismutase	Tobacco	Intense light under low temperatures (enhanced)		31,32
Mn-superoxide dismutase	Alfalfa	Low or freezing temperatures (enhanced)	Targeted to mitochondria or to chloroplast	33
Fe-superoxide dismutase	Alfalfa	Low or freezing temperatures (enhanced)	Targeted to chloroplast	34
Glutathione S-transferase/Glutathion peroxidase	Tobacco	Low temperatures and salt (enhanced)		35
<b>Compatible solutes</b>				
Betaine aldehyde dehydrogenase	Rice	High and low temperatures and salt(enhanced)	Targeted to peroxisomes, betaine aldehyde applied exogenously	36
Choline oxidase	Arabidopsis	High, low, and freezing temperatures and salt (enhanced)	Gene from a soil bacterium, targeted to chloroplast	
<b>Membrane lipids</b>				
Glycerol-3-phosphate acyltransferase	Tobacco	Low temperatures (enhanced/lessened)		37,38
Glycerol-3-phosphate acyltransferase	Rice	Low temperatures (enhanced)		39
Glycerol-3-phosphate acyltransferase	Arabidopsis	Low temperatures (lessened)		40
Chloroplast ω-3 fatty acid desaturase	Tobacco	High and low temperatures (enhanced)	Overexpression (low temperatures), gene silencing (high temperatures)	41,42,43
Endoplasmic reticulum ω-3 fatty acid desaturase	Rice	Low temperatures (enhanced)		44,45
D9 desaturase	Tobacco	Low temperatures (enhanced)	Gene from a cyanobacterium	46
Functions of transformed genes	Host plants	Effects on the enhancement of temperature and other stress tolerances	Remarks	Refs
Transcriptional factors (activators)				
Transcriptional activator (CBF1)	Arabidopsis	Freezing (enhanced)	Induction of COR gene expression	47
<i>cis</i> -acting promoter element (DREBIA)	Arabidopsis	Freezing, drought, and salt (enhanced)	Driven by the stress inducible rd29A promoter	48
Zinc finger protein (SCOF-1)	Arabidopsis Tobacco	Low temperatures (enhanced)	Induction of COR gene expression	49
Transcriptional activator (ABI3)	Arabidopsis	Freezing (enhanced)	Enhancement of ABA-induced expression of genes for cold acclimation	50
<b>Antifreezing protein</b>				
Carrot (Dac) AFP <sup>a</sup>	Tobacco	Freezing (enhanced)	AFP accumulated in apoplast, inhibited ice recrystallization and produced 0.35 to 0.56°C of thermal hysteresis	51
Carrot (Dac) AFP	Arabidopsis	Freezing (enhanced)	AFP accumulated in apoplast and modified ice crystal morphology	52
Carrot (Dac) AFP	Tobacco	Freezing (enhanced)	Survived supercooling to -2°C	53
Winter rye (Sc) chitinase-AFP	Arabidopsis	Freezing (enhanced)	AFP accumulated in apoplast with no effect on LT <sub>50</sub>	

<sup>a</sup>Abbreviation: AFP, antifreeze protein; Dac, *Daucus carota*; Sc, *Secale cereale*. Modified from Table 1 of Koh (2002) and Table 2 of Griffith and Yaish (2004).

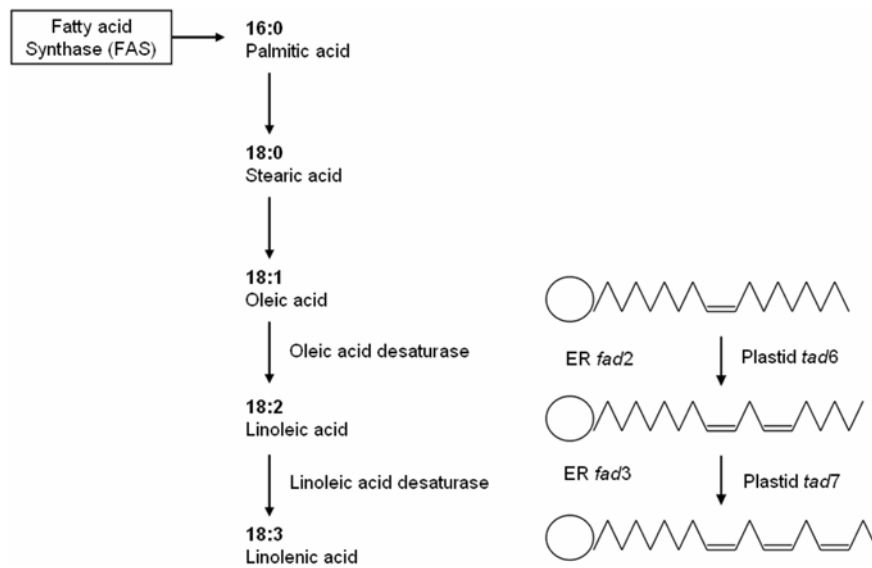


Fig. 5. Schematic drawing of the oleic acid desaturation in the plastids and at the endoplasmic reticulum (ER).

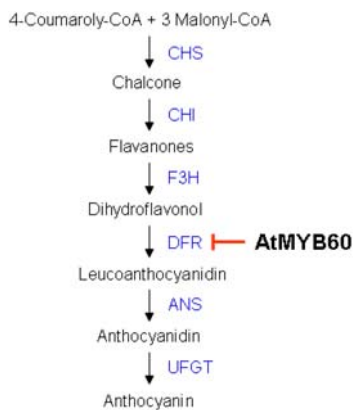


Fig. 6. Schematic representation of the relationship between AtMYB60 expression and the structural genes which play a role in anthocyanin biosynthesis.

을 지금의 디젤색과 흡사한 노란색 또는 투명에 가까운 색으로 만들기 위해서 세정단계를 여러 번 거쳐야만 하고 이로 인한 생산비 상승 및 기름손실의 결과를 초래하고 있다.

이와같은 유채종피색의 문제점을 해결하기 위한 목적으로 농촌진흥청 바이오에너지사업단에서 추진하고 있는 고품질 바이오원료작물의 품종개발이라는 사업과제 중 「노란종피색 유채 품종 개발」을 농업생명공학연구원에서 수행하고 있는 중이다. 안토시아닌색소 발현을 억제하는 새로운 유전자(MYB-type transcription factor)를 개발하여 적상추에 형질전환한 결과, 상추잎이 적색을 띠지 않은 것으로 보아 이 유전자가 안토시아닌 색소 발현을 억제하는데 관여하는 전사조절인자유전자일 것으로 추정하였다. 따라서 이 결과를 바탕으로 유채내 이 새로운 유전자를 도입하여 T1종자의 종피색을 관찰한 결과 종피색이 검은색에서 갈색으로 변화하였음을 알 수 있었다(Fig. 6). 금후 유전자의 고정과 집적을 통해서 노란색에 가까운 종피색을 지닌 유채 품종을 생산할 것이라 기대된다. 이 외에도 안토시아닌색소 관련 유전자인 DFR(Dihydroflavonol-4-reductase) 및 CHS

(Chalcone synthase)를 분리하여 유채내에서 발현을 억제시키는 실험을 수행 중 에 있다.<sup>28)</sup>

**내한성 증진.** 유채 품종은 크게 춘파용(Summer-type)과 추파용(Winter-type)으로 구분되는데, 춘파용의 경우 재배기간이 짧고, 여름철 병충해에 약해서 생산성이 크게 떨어지는 반면에 추파용은 재배기간이 길고 생산성이 높은 특징을 가지고 있다. 국내에서는 현재까지 대전이남 지역에서만이 유채의 추파 재배가 가능하다고 알려져 있는데, 그 이유는 유채는 본래 내한성이 약한 작물로서 영하 5도가 10일 이상 지속될 경우 지저부에 있는 생장점이 죽는다. 따라서 유채의 생산성을 확대하기 위해서는 내한성 증진이 절실하게 요구되어지는 실정이다. 지금까지 내한성 및 내동성 관련 유전자에 관한 많은 연구가 진행되어졌고, 식물내에서 내한성 및 내동성 기능이 검증된 실험결과를 Table 6과 같이 정리하였다.<sup>29,30)</sup> 내한성 관련 형질은 한 두 개의 유전자에 의하여 결정되기 보다는 변화하는 환경에 적응하는 진화과정을 거쳐 축적된 여러 개의 유전자가 상호 반응하여 얻어지는 결과물일거라 추정된다. 따라서 고 올레인산 유채 품종에 여러 개의 내한성 관련 유전자를 동시에 또는 개별로 발현시켜서 얻어진 계통들을 확보한 후, 계통 간 교잡육종을 해 나가면 내한성이 증진된 고 올레인산 유채 품종 개발이 가능하리라 사료된다.

## 초 록

지구 온난화의 주 원인인 온실가스의 배출을 감소시키기 위해서 바이오연료에 대한 필요성 및 중요성이 제기되어 왔다. 이미 유럽을 중심으로 오래전부터 바이오디젤 연료에 대한 연구가 시작되어 왔으며 지금은 상용화 단계에 접어들고 있는 반면, 국내 바이오디젤 연료에 대한 연구 수준은 이제 시작단계에 불과한 실정이다. 바이오디젤 연료로 사용가능한 유지작물의 지방산 조성에 따라 자동차 엔진 성능이 저하될 수 있다는 문제가 제기되었고, 이를 해결하고자 표준화된 바이오디젤 품질 규



격서가 마련되어졌다. 유럽에서 마련된 바이오디젤 규격에 의하면 올레인산 함량이 높은 기름이 바이오디젤 연료로 적합하며, 유채기름이 다른 유지작물의 기름에 비하여 바이오디젤 연료에 적합하다고 알려져 있다. 따라서 국내 유지작물의 바이오디젤 연료화를 위한 품질 개량과 생산량 증대를 위해 생명공학 기술을 이용한 품종 개량에 관한 연구 전략에 대해 고찰하였다.

**Key words:** Biodiesel, oil-crops, Brassica napus, oleic acid, cold stress

### 감사의 글

본 논문은 2007년도 농촌진흥청 친환경바이오에너지연구사업(06-3-23-2-2)과 농업생명공학연구원의 기관고유사업(06-3-11-12-2) 지원에 의해 이루어졌으며 이에 감사를 드립니다.

### 참고문헌

1. Frondel, M. and Peters, J. (2007) Biodiesel: A new Oildorado? *Energy Policy* **35**, 1675-1684.
2. Nitske, W. R. and Wilson, C. M. (1965) In *Rudolph Diesel, pioneer of the age of power*, University of Oklahoma Press, Norman, Oklahoma.
3. Gurr, M. I., Harwood, J. L. and Frayn, K. N. (2002) In *Lipid Biochemistry* (5th ed.), pp. 13-101. Blackwell Science Ltd, Oxford, UK.
4. Rozenaal, A. (1992) Interesterification of fats. *Inform* **3**, 1232-1237.
5. Allen, J. C. (1955) Determination of unsaturation. *Journal of American Oil and Chemists' Society* **32**, 671-674.
6. Frankel, E. N. (1998) In *Lipid Oxidation*, The Oily Press Ltd, Dundee, Scotland.
7. Erickson, D. R. and List, G. R. (1985) Fat degradation reactions. In *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*, (3rd ed.) John Wiley & Sons, Inc., Toronto, Canada, pp. 275-277.
8. Gray, J. I. (1978) Measurement of lipid oxidation: a review. *Journal of American Oil and Chemists' Society*, **55**, 539-546.
9. Formo, M. W. (1979) Physical properties of fats and fatty acids. In *Bailey's Industrial Oil and Fats*, John Wiley & Sons, Inc., Toronto, Canada, pp. 177-232.
10. Nourredini, H., Teoh, B. C. and Clements, L. D. (1992b) Viscosities of vegetable oils and fatty acids. *Journal of American Oil and Chemists' Society*, **69**, 1189-1191.
11. Prankl, H. and Wrgetter, M. (1995) Standardisation of biodiesel on a European level. Proceedings 3rd European Motor Biofuels Forum, Brussels, Belgium.
12. Bengtsson, L., Von Hofen, A. and Löf, B. (1972) Botany of rapeseed. In: *Rapeseed Cultivation, Composition, Processing and Utilization*. pp. 36-48. Elsevier Publishing Company. London
13. Saurer, F. D. and Kramer, J. K. G. (1983) The problems associated with the feeding of high erucic acid rapeseed oils and some fish oils to experimental animals. In: *High and Low Erucic Acid Rapeseed Oils Production, Usage, Chemistry, and Toxicological Evaluation*. pp. 254- 292. Academic Press, Toronto.
14. Daun, J. K. and Adolphe, D. F. (1997) A revision to the canola definition. *Bulletin of GCIRC*, **14**, 134-141.
15. Daun, J. K. (1984) Composition and use of canola seed, oil and meal. *Cereal Foods World*, **29**, 291-296.
16. Jang, Y. S., Kim, C. W., Choi, I. H., Oh, Y. B., Jung, B. C. and Kim, S. T. (2002) Yield performance and local adaptability of rapeseed F1 hybrids. *Korean J. Breed.* **34**, 41-45
17. Jang, Y. S., Kim, C. W., Choi, I. H., Oh, Y. B., Jung, B. C. and Park, J. H. (2002) Method of seed production of F1 hybrids in *Brassica napus* L. *Korean J. Breed.* **34**, 158-162.
18. Jang, Y. S., Kim, C. W., Choi, I. H., Oh, Y. B., Jung, B. C., Bang, J. K., Kwon, B. S. and Lee, J. I. (2002) Development of maintainer and Mokpo-CGMS in Oilseed rape (*Brassica napus* L.) *Korean J. Breed.* **34**, 163-167.
19. Jang, Y. S., Choi, I. H., Oh, Y. B., Cho, S. Y., Chong, D. H. and Oh, H. J. (1998) A new early-maturing, flower of large size and the use of sightseeing rapeseed variety "Tammiyuchae". *J. Indus. Crop Sci.* **40**, 67-70.
20. Auld, D., Heikkinen, M. K., Erickson, D. A., Sernyk, L. and Romero, E. (1992) Rapeseed mutants with reduced levels of polyunsaturated fatty acid levels and increased levels of oleic acid. *Crop Sci.* **32**, 657-662.
21. Rcker, B. and Rbbelen, G. (1995) Development of high oleic acid rapeseed. In: *Rapeseed Today and Tomorrow. Proceedings of 9th International Rapeseed Congress*, Vol. 2, pp. 389-391, Cambridge, UK.
22. DeBonte, L. R. and Hitz, W. D. (1998) Canola oil having increased oleic acid and decreased linolenic acid content. *US Patent* No. 5850026.
23. Stoutjesdijk, P. A., Hurlstone, C., Singh, S. P. and Green, A. G. (1999) Genetic manipulation for altered oil quality in Brassica. In *New Horizons for an Old Crop*. Proceedings of 10th International Rapeseed Congress, pp. 26-29, Wratten, N. and Salisbury, P. A., Canberra, Australia.
24. Rakow, G. and Raney, P. (2001) Low saturated fat Brassica napus. *GCIRC Technical Meeting*, B18, Poznan, Poland.
25. Knutzon, D. S., Thompson, G. A., Radke, S. E., Johhson, W. B., Knauf, V. C. and Kridl, J. C. (1992) Modification of *Brassica* seed oil by antisense expression of a stearyl-acyl carrier protein desaturase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**, 2624-2628.
26. Hildebrand, D. F. and Grayburn, S. W. (1999) Fatty acid alteration by a 9 desaturase in transgenic plant tissue. *US Patent* No. 5,866,789.
27. Rakow, G., Relf-Eckstein, J., Raney, J. P. and Gugel, R. (1999) Development of high yielding disease resistant, yellow-seeded *Brassica napus*. In: *New Horizons for an Old Crop*. Proceedings of 10th International Rapeseed

- Congress, Canberra, Australia.
28. Park, J. S., Choung, M. G., Kim, J. B., Kim, J. B., Bae, S. C., Roh, K. H., Kim, Y. H., Cheon, C. I., Sung, M. K., and Cho, K. J. (2007) Genes up-regulated during red coloration in UV-B irradiated lettuce leaves. *Plant Cell Rep.* **26**, 507-517.
  29. Iba, K. (2002) Acclimative response to temperature stress in higher plant: Approaches of gene engineering for temperature tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **53**, 225-245.
  30. Griffith, M. and Yaish, M. W. F. (2004) Antifreeze proteins in overwintering plants: a tale of two activities. *Trends in Plant Science* **9**, 399-405.
  31. Sen Gupta, A., Heinen, J. L., Holaday, A. S., Burke, J. J. and Allen, R. D. (1993) Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants that overexpress chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**, 1629-1633.
  32. Sen Gupta, A., Webb, R. P., Holaday, A. S. and Allen, R. D. (1993) Overexpression of superoxide dismutase protects plants from oxidative stress. *Plant Physiol.* **103**, 1067-1073.
  33. McKersie, B. D., Bowely, S. R. and Jones, K. S. (1999) Winter survival of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutase. *Plant Physiol.* **119**, 839-847.
  34. McKersie, B. D., Murnaghan, J., Jones, K. S. and Bowely, S. R. (2000) Iron-superoxide dismutase expression in transgenic alfalfa increases winter survival without a detectable increase in photosynthetic oxidative stress tolerance. *Plant Physiol.* **122**, 1427-1437.
  35. Roxas, V. P., Smith, R. K. Jr., Allen, E. R., and Allen R. D. (1997) Overexpression of glutathione S-transferase/ glutathione peroxidase enhances the growth of transgenic tobacco seedlings during stress. *Nat. Biotechnol.* **15**, 988-991.
  36. Kishitani, S., Takanami, T., Suzuki, M., Oikawa, M., and Yokoi, S. (2000) Compatibility of glycinebetaine in rice plants: evaluation using transgenic rice plants with a gene for peroxisomal betaine aldehyde dehydrogenase from barley. *Plant Cell Environ.* **23**, 107-114.
  37. Moon, B. Y., Higashi, S., Gombos, Z. and Murata, N. (1995) Unsaturation of the membrane lipids of chloroplasts stabilizes the photosynthetic machinery against low-temperature photoinhibition in transgenic tobacco plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**, 6219-6223.
  38. Murata, N., Ishizaki-Nishizawa, O., Higashi, S., Hayashi, H. and Tasaka, Y. (1992) Genetically engineered alteration in the chilling sensitivity of plants. *Nature* **356**, 710-713.
  39. Yokoi, S., Higashi, S., Kishitani, S., Murata, N. and Toriyama, K. (1998) Introduction of the cDNA for *Arabidopsis* glycerol-3-phosphate acyltransferase(GPAT) confers unsaturation of fatty acids and chilling tolerance of photosynthesis on rice. *Mol. Breed.* **4**, 269-275.
  40. Wolter, F. P., Schmidt, R. and Heinz, E. (1992) Chilling sensitivity of *Arabidopsis thaliana* with genetically engineered membrane lipids. *EMBO J.* **11**, 4685-4692.
  41. Kodama, H., Hamada, T., Horiguchi, G., Nishimura, M. and Iba, K. (1994) Genetic enhancement of cold tolerance by expression of a gene for chloroplast  $\bullet^{-3}$  fatty acid desaturase in transgenic tobacco. *Plant Physiol.* **105**, 601-605.
  42. Kodama, H., Horiguchi, G., Nishiuchi, T., Nishimura, M. and Iba, K. (1995) Fatty acid desaturation during chilling acclimation is one of the factors involved in conferring low-temperature tolerance to young tobacco leaves. *Plant Physiol.* **107**, 1177-1185.
  43. Murakami, Y., Tsuyama, M., Kobayashi, Y., Kodama, H. and Iba, K. (2000) Trienoic fatty acids and plant tolerance of high temperature. *Science* **28**, 476-479.
  44. Hamada, T., Kodama, H., Takeshita, K., Utsumi, H. and Iba, K. (1998) Characterization of transgenic tobacco with an increased  $\bullet$ -linolenic acid level. *Plant Physiol.* **118**, 591-598.
  45. Shimada, T., Wakita, Y., Otani, M. and Iba, K. (2000) Modification of fatty acid composition in rice plants by transformation with a tobacco microsomal  $\bullet^{-3}$  fatty acid desaturase gene (*NtFAD3*). *Plant Biotechnol.* **17**, 43-48.
  46. Ishizaki-Nishizawa, O., Fujii, T., Azuma, M., Sekiguchi, K. and Murata, N. (1996) Low-temperature resistance of higher plants is significantly enhanced by a nonspecific cyanobacterial desaturase. *Nat. Biotechnol.* **14**, 1003-1006.
  47. Jaglo-Ottosen, K. R., Gilmour, S. J., Zarka, D. G., Schabenberger, O. and Thomashow, M. F. (1998) *Arabidopsis* CBF1 overexpression induces *COR* genes and enhances freezing tolerance. *Science* **280**, 104-106.
  48. Kasuga, M., Liu, Q., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (1999) Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nat. Biotechnol.* **17**, 287-291.
  49. Kim, J. C., Lee, S. H., Cheong, Y. H., Yoo, D-. M., and Lee, S. I. (2001) A novel cold-inducible zinc finger protein from soybean, SCOF-1, enhances cold tolerance in transgenic plants. *Plant J.* **25**, 247-259.
  50. Tamminen, I., Mkel, P., Heino, P., and Palva, E. T. (2001) Ectopic expression of *ABI3* gene enhances freezing tolerance in response to abscisic acid and low temperature in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **25**, 1-8.
  51. Worrall, D., Elias, L., Ashford, D., Smallwood, M. Sidebottom, C. Lillford, P. Telford, J. Holt, C. and Bowles, D. (1998) A carrot leucine-rich repeat protein that inhibits ice recrystallization. *Science* **282**, 115-117.
  52. Meyer, K., Keil, M. and Naldreff, M. J. (1999) A leucine-rich repeat protein of carrot that exhibits antifreeze activity. *FEBS Lett.* **447**, 171-178.
  53. Fan, Y., Liu, B., Wang, H., Wang, S. and Wang, J. (2002) Cloning of antifreeze protein gene from carrot and its influence on cold tolerance in transgenic tobacco plants. *Plant Cell Rep.* **21**, 296-301.