



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0006922

(43) 공개일자 2015년01월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 1/12 (2006.01) *C12P 7/64* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0080198

(22) 출원일자 2013년07월09일

심사청구일자 2013년07월09일

(71) 출원인

인하대학교 산학협력단

인천광역시 남구 인하로 100, 인하대학교 (용현동)

(72) 발명자

이철균

서울 서초구 신반포로 270, 104동 801호 (반포동, 반포자이)

임상민

인천 부평구 부흥로 246, 21동 1103호 (부평동, 동아2단지아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

한윤호, 양기혁, 이인행, 김남식

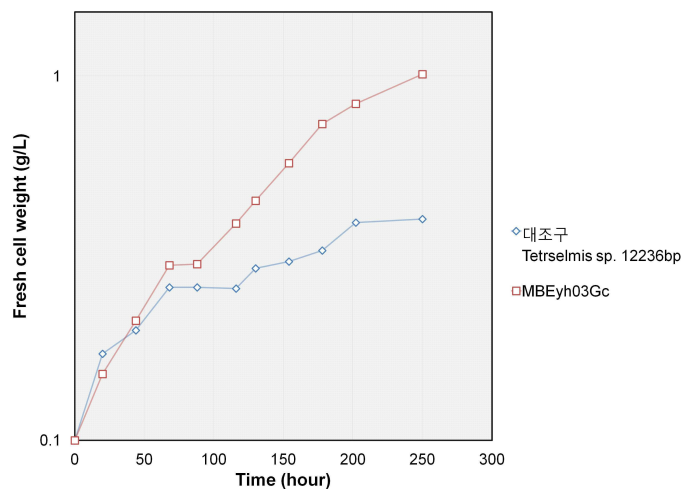
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 신규 테트라셀미스 MBEyh03Gc 균주 (KCTC 12431BP) 및 이를 이용한 바이오디젤의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 0~37℃의 온도조건에서 성장하는 신규 테트라셀미스 MBEyh03Gc (*Tetraselmis* sp. MBEyh03Gc) 균주(수탁번호 KCTC 12431BP) 및 상기 균주를 이용한 바이오디젤 생산 방법을 제공한다.

대표도 - 도3a



(72) 발명자

허동희

인천 부평구 부영로 165, 115동 603호 (산곡동, 우성아파트)

김지훈

인천 서구 신진말로 16, 바동 1호 (가좌동, 신한연립)

박한울

인천 남구 인주대로252번길 25, 204호 (용현동)

신동우

충청북도 제천시 의림동 7-2번지

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	46564-1
부처명	해양수산부
연구관리전문기관	한국해양과학기술진흥원
연구사업명	해양바이오에너지생산기술개발사업
연구과제명	미세조류유래 바이오디젤 생산기술개발
기 여 율	97/100
주관기관	인하대학교 산학협력단
연구기간	2012.09.01 ~ 2013.07.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	47402-1
부처명	해양수산부
연구관리전문기관	한국해양과학기술진흥원
연구사업명	해양에너지 특성화 대학원 지원사업
연구과제명	해양에너지 특성화 대학원 지원사업
기 여 율	3/100
주관기관	인하대학교 산학협력단
연구기간	2013.03.01 ~ 2014.02.28

특허청구의 범위

청구항 1

신규 테트라셀미스 MBEyh03Gc(*Tetraselmis* sp. MBEyh03Gc) 균주(수탁번호 KCTC 12431BP).

청구항 2

제1항에 있어서,

서열번호 1의 핵산서열을 갖는 rDNA를 갖는, 신규 테트라셀미스 균주.

청구항 3

제1항의 신규 테트라셀미스 균주를 유효성분으로 함유하는 바이오디젤 생산용 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 신규 테트라셀미스 균주를 배양배지에 넣고 광조사 하에 배양하는 배양단계; 및

회수된 균주에 촉매를 가하여 상기 균주 내에 존재하는 지방산 글리세롤을 지방산 에스터로 전환시키는 지방산 에스터 전환단계를 포함하는 바이오디젤의 생산방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 지방산 에스터 전환단계 후 형성된 조바이오디젤로부터 바이오디젤을 정제하는 바이오디젤 정제단계가 추가로 포함되는, 바이오디젤의 생산방법.

명세서

기술분야

[0001]

본 발명은 신규 미세조류 균주 및 이를 이용한 바이오디젤의 제조방법에 관한 것으로서, 더 상세하게는 신규 테트라셀미스 MBEyh03Gc 균주 및 이를 이용한 바이오디젤의 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002]

석유 매장량은 줄어드는 반면, 인구의 증가로 인한 에너지 사용량의 증가로 대체 에너지 자원의 개발이 대두되고 있다. 지구 온난화와 같은 환경 문제를 악화시키지 않는 자연친화적이며 지속가능한 대체에너지의 개발이 시급하다. 그러한 대체에너지로 태양광, 풍력, 지열, 조력 등을 이용하여 전력을 생산하는 방법이 집중적으로 연구되고 있다. 그러나, 상기와 같은 지구 물리현상을 이용하여 생산된 전기로는 선박, 비행기 등에 사용할 수송용 에너지원을 대체할 수 없고 현재 사용하고 있는 모든 인프라를 사용하기 위해서는 액체 저장용 에너지원이 필요하다. 따라서, 이 상기 조건을 충족시킬 대체 에너지 자원으로 바이오디젤이 각광받고 있다. 바이오 디젤은 동물성 지질, 식물성 지질 등의 지질을 에스터 전환반응(transesterification)을 통하여 얻어 낼 수 있으며 1, 2 세대 바이오디젤은 옥수수, 사탕수수와 같은 식량자원을 사용하여 식량자원의 급격한 가격상승을 유발하였다. 따라서 식량자원과 대립하지 않는 지질자원의 확보가 필수적이며, 이에 광합성으로 지질을 축적시키는 미세조류가 사용될 수 있다. 미세조류는 빛, 물, 이산화탄소를 이용하여 광합성을 통해 C, H, O, N, P 기반의 바이오매스를 생산하며, 식량자원 보다 광합성 효율이 높아 바이오디젤의 지질자원으로 사용하기에 적합하다. 미세조류는 20,000종 이상으로 종류가 다양하며 종마다 지질의 함량, 지질의 특성, 성장 속도가 다르므로 경제적이고 품질이 우수한 바이오디젤을 생산하기 위해서는 우수한 종을 선정해야 한다. 또한, 이를 이용하여 미세조류 기반의 바이오디젤을 생산하기 위해서는 운전비용과 설비비용이 적게 드는 미세조류의 저가 대량배양이 이루어져야 하므로, 육외 배양을 이용해야 하며, 이는 육지와 해양 배양으로 분류 할 수 있다. 육외 배양에 이용되는 육지는 계절적, 일교차의 온도차이가 많이 나며, 지역에서 따라서 10~35℃ 이상의 기온 변화가 나타난다(Bechet *et al.*, *Evniron. Sci. Technol.*, 44(6): 2197-2203, 2010). 온도가 낮아지게 되면 미세조류의 성장이 저해된다

(Munoz & Guieysse, *Water Res.*, 40(15): 2799-2815, 2006). 특히 사계절이 뚜렷한 대한민국에서 육지 옥외배양은 온도차가 크기 때문에 미세조류 생장에 문제가 된다. 따라서, 물의 높은 비열로 비교적 계절마다 온도 변화가 적은 해양에서의 대량 배양이 유리하다. 또한 해양배양에서 미세조류를 생산하면 해양의 파력 에너지와 풍부한 영양 염류 등을 활용 할 수 있다. 미세조류는 일반적으로 20-25℃ 근방의 온도에서 가장 잘 생육하고 추운 기후에서는 생육이 어려운 성질이 있다(Li, Temperature adaptation in phytoplankton: cellular and photosynthetic characteristics. In: Fakowski, P. G. (ed.) Primary Productivity in the Sea. Plenum Press, New York and London, pp. 259-279, 1980). 대한민국에서 해양의 수온은 겨울과 봄철에 수온이 5~10℃, 여름과 가을철엔 10~20℃로 분석되고 있으며 따라서 사계절 동안 해양에서 대량배양하기 위해 해양 미세조류 중 저온에서 생육이 우수한 종의 개발이 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0003] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 포함하여 여러 문제점들을 해결하기 위한 것으로서, 다양한 환경조건 하에서 안정적으로 바이오디젤을 대량생산할 수 있는 신규 테트라셀미스 균주를 제공하는 것을 목적으로 한다. 그러나 이러한 과제는 예시적인 것으로, 이에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

과제의 해결 수단

[0004] 본 발명의 일 관점에 따르면, 신규 테트라셀미스(*Tetraselmis* sp.) MBEyh03Gc 균주(수탁번호 KCTC 12431BP)가 제공된다. 상기 균주는 0~37℃의 온도범위에서 생장이 가능하여 저온 성장능력을 가지고 있는 것을 특징으로 한다.

[0005] 상기 균주는 서열번호 1의 핵산서열을 갖는 rDNA를 갖는다.

[0006] 본 발명의 일 실시예에 따른 신규 테트라셀미스 균주는 동속의 테트라셀미스 수에시카(*T. suecica*) 균주에 비하여, 저온에서도 빠르게 성장하며 생육가능한 온도 범위가 매우 넓고, 야외에서도 생육이 가능하다. 상술한 바와 같이, 미세조류는 온도변화, 환경 스트레스에 의하여 생육이 용이하지 않기 때문에, 본 발명의 일 실시예에 따른 신규 테트라셀미스 균주는 이러한 문제를 해결하며, 산업적 활용 가능성이 매우 우수하다

[0007] 본 발명의 다른 관점에 따르면, 상기 신규 테트라셀미스 균주를 유효성분으로 함유하는 바이오디젤 생산용 조성물이 제공된다. 상기 조성물에는 상기 신규 테트라셀미스 균주 내의 지질에 대한 에스터 전환반응을 유도하기 위한 촉매, 저급알코올 및 지방산 에스터의 분리정제를 위한 비극성 유기용매가 포함될 수 있다. 이때 상기 촉매는 액체촉매 또는 고체촉매일 수 있고, 상기 액체촉매는 황산, 염화아세트 또는 황산/메탄올 혼합용액일 수 있고, 상기 고체촉매는 산처리된 바이오숏일 수 있다. 상기 저급알코올은 메탄올 또는 에탄올일 수 있고, 상기 비극성 유기용매는 펜탄, 사이클로펜탄, 헥산, 사이클로헥산, 벤젠, 톨루엔, 1,4-디옥산, 클로로포름 또는 디에틸 에테릴 수 있다.

[0008] 본 발명의 다른 관점에 따르면, 상기 신규 테트라셀미스(*Tetraselmis* sp. MBEyh03Gc) 균주를 배양매지에 넣고 광조사 하에 배양하는 배양단계; 회수된 균주에 촉매를 가하여 상기 균주 내에 존재하는 지방산 글리세롤을 지방산 에스터로 전환시키는 지방산 에스터 전환단계를 포함하는 바이오디젤의 생산방법이 제공된다.

[0009] 상기 바이오디젤의 생산방법에 있어서, 상기 지방산 에스터 전환단계 후 형성된 바이오디젤로부터 바이오디젤을 정제하는 바이오디젤 정제단계가 추가로 포함될 수 있다.

[0010] 본 발명자는 저온에서 빠른 속도로 성장하고, 해양배양 장치에 우수한 적응성을 보유한 균주를 개발하기 위해서 해양 배양장이 위치한 영흥도 화력발전소 내 바닷가에서 겨울철 해수를 수집하여 토착 미세조류를 분리하였다. 그 중 저온에서도 성장속도가 우수하고 지방산 메틸에스터로 전환 가능한 지질 함량이 높은 종을 선별하고 동정한 결과 테트라셀미스 속으로 밝혀졌다. 종래 동속 균주보다 저온에서 생체 중량 생산성이 우수하고, 해양배양장의 토착종이기 때문에 적응성이 우수할 뿐만 아니라, 지방산 메틸에스터로 전환될 수 있는 지질함량이 높기 때문에 경제적인 바이오디젤 생산을 위한 적합한 균주로 선정되어 생명공학연구원의 미생물자원센터(KCTC)에 2013년 6월 21일자로 특허 기탁하였다(수탁번호 KCTC 12431BP).

발명의 효과

[0011] 본 발명에 따른 테트라셀미스는 저온뿐만 아니라 다양한 온도조건에서 배양이 가능하며 해양배양장의 토착종을

분리하였기 때문에 환경 적응성이 우수하다. 한국과 같은 기후조건에 적합한 해양 옥외배양용 미세조류를 제공하였다. 또한, 기존의 가스 크로마토그래피(gas chromatography) 분석법으로 동속 군주의 테트라셀미스 종보다 높은 지방산 메틸에스터로 전환 가능한 지질 생산성이 높은 점을 확인함으로써 바이오디젤을 대량 생산할 수 있는 가능성을 밝혔다. 그러나, 이러한 효과에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

도면의 간단한 설명

[0012]

도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 신규 테트라셀미스 군주인 *Tetraselmis* sp. MBEyh03Gc를 현미경으로 관찰한 사진이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 신규 테트라셀미스 군주인 *Tetraselmis* sp. MBEyh03Gc의 18s rDNA의 핵산 서열(서열번호 1)이다.

도 3a는 본 발명의 일 실시예에 따른 신규 테트라셀미스 군주인 *Tetraselmis* sp. MBEyh03Gc와 대조구인 *Tetraselmis* sp. KCTC 12236BP의 10℃에서의 바이오매스 성장곡선을 비교한 그래프이고, 도 3b는 상기 군주들의 5℃에서의 바이오매스 성장곡선을 비교한 그래프이다.

도 4a는 본 발명의 일 실시예에 따른 신규 테트라셀미스 군주인 *Tetraselmis* sp. MBEyh03Gc와 대조구인 *Tetraselmis* sp. KCTC 12236BP의 지방산 메틸에스터의 생산성을 비교한 그래프이고, 도 4b는 상기 군주들로부터 생산된 지방산 메틸에스터의 조성을 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013]

이하 실시예를 통하여 본 발명을 상세히 설명한다. 하지만 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있다.

[0014]

실시예 1: 군주의 분리

[0015]

대한민국 영흥도 화력 발전소 내의 해양 실증 배양장 인근의 해수를 채집하여 미세조류 분리를 진행하였다. 여과지를 이용하여 해수 시료에 낮은 농도로 존재하는 미세조류를 농축시킨 후 이를 인공해수(MBL)에 f/2 3x를 넣어 멸균시킨 배지에 접종시켰다. 인공해수를 사용함으로써 자연해수에 서식하는 미생물들의 성장을 배제하였고, f/2 배지의 3배의 양을 넣어줌으로써 미세조류 분리시간을 단축시킬 수 있었다. MBL의 조성은 하기 표 1과 같다.

[0016]

상기에 접종된 세포를 MBL f/2 한천(agar) 1.5% 평판배지에 도말하여 10℃ 인큐베이터에서 $35 \pm 5 \mu \cdot \text{Em}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 광도의 형광등을 연속적으로 조사하면서 3주간 배양하였다. 빠르게 군락을 형성한 미세조류를 클린벤치 안에서 백금으로 채취하여 평판배지에 선형도말(streaking)하였다. 다음과 같은 실험을 5번간 반복하여 순수한 미세조류 군락을 얻어 낼 수 있었다.

[0017]

상기에서 얻은 미세조류 군락을 24 웰 플레이트를 이용하여 MBL f/2 배지 1 ml에 연속적인 광을 조사하여 1주간 배양하였다. 배양한 군주 중에서 성장성이 우수한 군주를 선택하여 100 ml 10℃, $35 \pm 5 \mu \cdot \text{Em}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 광도를 연속적으로 조사하면서 150 rpm으로 교반시켜 세포를 배양하였다. 이 후에 주기적으로 계대배양을 실시하였다.

표 1

[0018]

MBL+f/2 배지 조성(1 L 기준)

화합물	사용량
NaNO ₃	0.075 g
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	0.005 g
미량 금속 용액(trace metal solution)	1 ml
인공 해수(MBL)	1 ml
미량 금속 용액 (1 L 기준)	
FeCl ₃ · 6H ₂ O	3.15 g
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	4.36 g
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.0098 g
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.0063 g

ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.022 g
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.01 g
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0.018 g
인공 해수(MBL, 1 L 기준)	
NaCl	24.7 g
KCl	0.66 g
MgCl ₂ · 6H ₂ O	8.48 g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	1.9 g
MgSO ₄	3.07 g
NaHCO ₃	0.18 g

실시예 2: 균주의 동정

실시예 1에서 분리하고, 배양한 미세조류를 동정하기 위해서 상기에서 선별된 균주에 대해 현미경을 통한 형태학적 관찰과 18s rDNA 핵산서열 분석 실험을 진행하였다.

선별된 균주의 게놈(genomic) DNA를 분리하고, 18s rRNA 유전자 PCR과 분리 정제를 진행하였다. 18s rDNA 유전자의 PCR에 사용한 프라이머쌍에 대한 정보는 표 2에 기재되어 있다. 정제된 PCR 산물에 대하여 핵산서열을 분석하였으며 서열상동성 분석 프로그램(Blast search 및 cluster W)을 통하여 다중 핵산서열을 비교하여 유사도 분석을 진행하였다. 그 결과 609 bp의 PCR 산물로부터 분리한 균주의 18S rDNA 단편의 핵산서열(도 2)을 확인할 수 있었다(서열번호 1). 상기 핵산서열을 대상으로 NCBI의 BLAST를 사용하여 상동성을 분석한 결과, *Tetraselmis striata* 및 *Tetraselmis* 속의 여러 종들과 핵산서열상 99%가 일치한 결과가 나왔으며, 이에 상기 분리된 균주를 *Tetraselmis* 속에 속하는 균주로 동정하여, 이를 *Tetraselmis* sp. MBEyh03Gc로 명명하고, 생명공학연구원의 미생물자원센터(KCTC)에 2013년 6월 21일자로 특허 기탁하였다(수탁번호 KCTC 12431BP).

표 2

18S rDNA 단편의 PCR을 위해 사용된 프라이머

서열번호 2	정방향 프라이머	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'
서열번호 3	역방향 프라이머	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

실시예 3: 테트라셀미스 sp. MBEyh03Gc의 저온에서의 성장성

본 발명의 일 실시예에서 분리 및 동정한 *Tetraselmis* sp. MBEyh03Gc의 저온에서의 성장성을 확인하였다. 대조구로 테트라셀미스(*Tetraselmis*) sp. KCTC 12236BP를 사용하였다.

250 ml 삼각플라스크를 사용하였으며 실리 스토퍼로 마개를 하여 배양하였다. 인공해수 MBL에 f/2 배지를 넣어 총 100 ml의 부피가 되도록 하고, 초기 접종 생체 중량을 0.1 g/L 농도로 접종하고, 10℃에서 35 $\mu \cdot \text{Em}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 의 광도로 형광등을 연속적으로 조사하면서 150 rpm으로 진탕하며 배양하였다. 상기 MBL+f/2 배지의 조성은 표 1에 기재된 바와 같다.

쿨터 카운터(모델 multi-sizer, Coulter Electronics, Inc., Hialeah, FL. U.S.A.)를 사용하여 10일간 세포농도를 측정한 결과, 테트라셀미스 sp. MBEyh03Gc는 1.01 g/L까지 성장하였고, 대조구인 테트라셀미스 sp. KCTC 12236BP는 0.4 g/L로 생육이 저조하였다. 테트라셀미스 sp. MBEyh03Gc의 바이오매스 생산성은 0.087 g/L/day로 대조구의 0.029 g/L/day에 비해 약 3배 높은 생산성을 나타내었다(도 3a).

이어, 본 발명자는 온도 조건을 5℃로 변경하고, 그 외의 조건은 모두 동일하게 하여 본 발명의 일 실시예에 따른 *Tetraselmis* sp. MBEyh03Gc의 저온에서의 성장성을 확인하였다. 대조구로 테트라셀미스(*Tetraselmis*) sp. KCTC 12236BP를 사용하였다. 그 결과, 5℃의 온도에서도 대조구 대비 생육이 우수하였으며, 대조구에 비하여 약 1.7배 가량의 우수한 생육정도를 나타냈다(도 3b).

실시예 3: 테트라셀미스 sp. MBEyh03Gc를 이용한 바이오디젤의 제조

실시예 2에서 진행한 실험을 통해 얻어진 미세조류를 회수하여 바이오디젤을 생산하였다. 회수된 세포를 동결건

조 한 후 염화 아세틸(acetyl chloride)과 메탄올 및 헥산으로 에스터 전환반응을 유도한 후 가스 크로마토그래피 분석을 통하여 지방산메틸에스터(fatty acid methyl ester, 이하, 'FAME'이라 함)의 함량과 성분을 분석하였다. *Tetraselmis* sp. MBEyh03Gc로부터 추출한 바이오디젤 지방산의 FAME 생산성은 대조구에 비하여 3.7배 이상 높은 것으로 나타났다(도 4a). 조성은 C16:0 23.2%, C18:1 10.4%, C18:2 13.6%, C18:3 23.8%로 4가지 지방산성분이 주요 조성을 이루는 바이오디젤이었다(도 4b).

[0030]

본 발명은 상술한 실시예를 참고로 설명되었으나 이는 예시적인 것에 불과하며, 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 이로부터 다양한 변형 및 균등한 다른 실시예가 가능하다는 점을 이해할 것이다. 따라서 본 발명의 진정한 기술적 보호 범위는 첨부된 특허청구범위의 기술적 사상에 의하여 정해져야 할 것이다.

수탁번호

[0031]

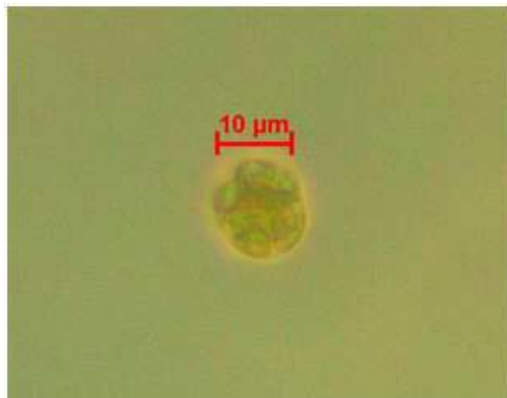
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC12431BP

수탁일자 : 20130621

도면

도면1

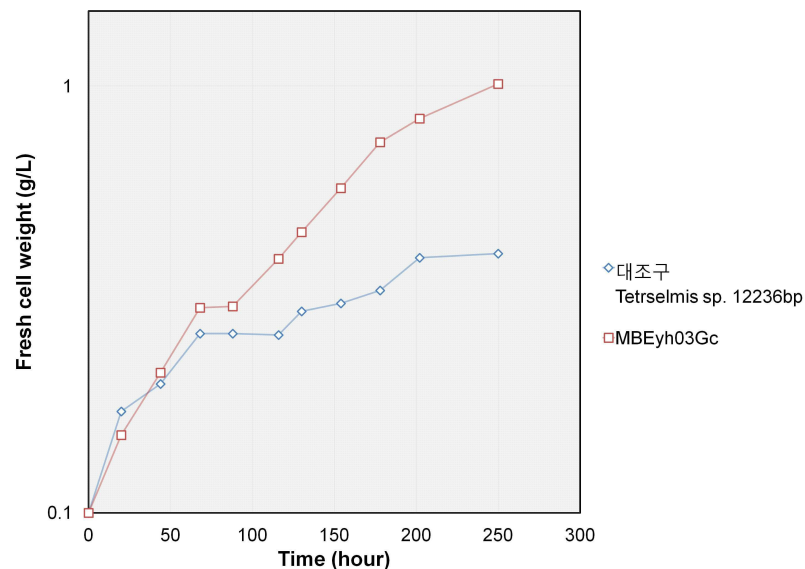


도면2

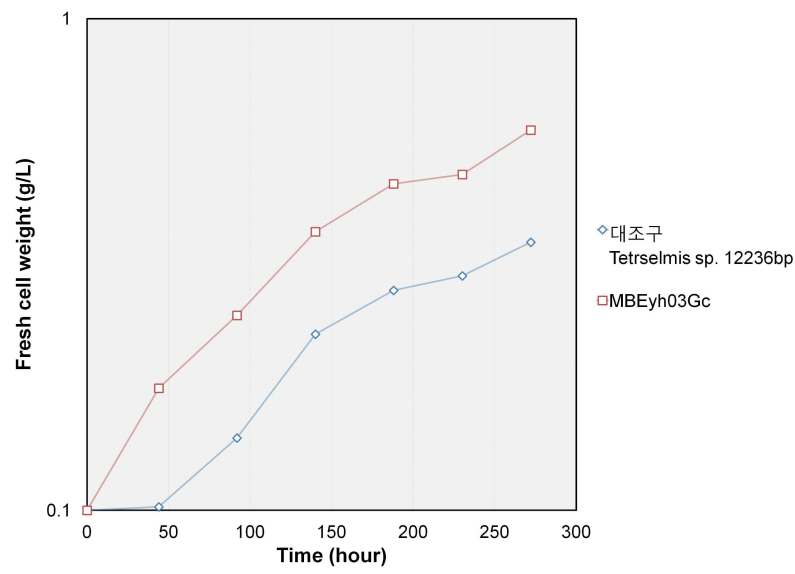
서열번호 1

TCTCGTCTGACTAGGTCGAGGTTTAAGTTGTTTTCTGCTGATCACGGCCAGGCCTTGGAC
ACGCACAGGAATAACCCGAAGGCTACCTACCTAGTGTTTGGCCATAATAGGGTCCTGTCTG
GATCTCTGCACTTCAGCAGACCCATGCGCATTGCTGCCAATGAGACTGCCAGGTCCAATCC
GCCGCCCGCCCCCGGTGAAGGGGGGGTTGGGGGGTTGAGGGGAAAACCGACTCTGAGGC
AGGCGTGCTCTTGCCGAGGCCTCGAGCGCAATATGCGTTCAAAGATTCGATGGTTCACGG
AATTCTGCAATTCACACTACGTATCGCATTTGCTGCGTTCTTCATCGTTGTAAGAGCCAA
GATATCCGTTGTTGAGAGTTGTCTTTGGTTAGGCGGTATCGCACGGGGCAATACGCACATA
GCTTTAGACGTTGTTTTGGTGTGGAGTGTTTAAATAACGCCAGCCCAGCCGCCCGAGACGC
CTAAGTTAATAGGAGCGCCCCGTGTTTGAGGGCGGTGAGCCCGACTGGGAACGCATCCCAG
CCGCACCAAGGCCCGCGAGGGTCCCGGGTGGGAGACAGAACGGTCACATGGTGATGATC

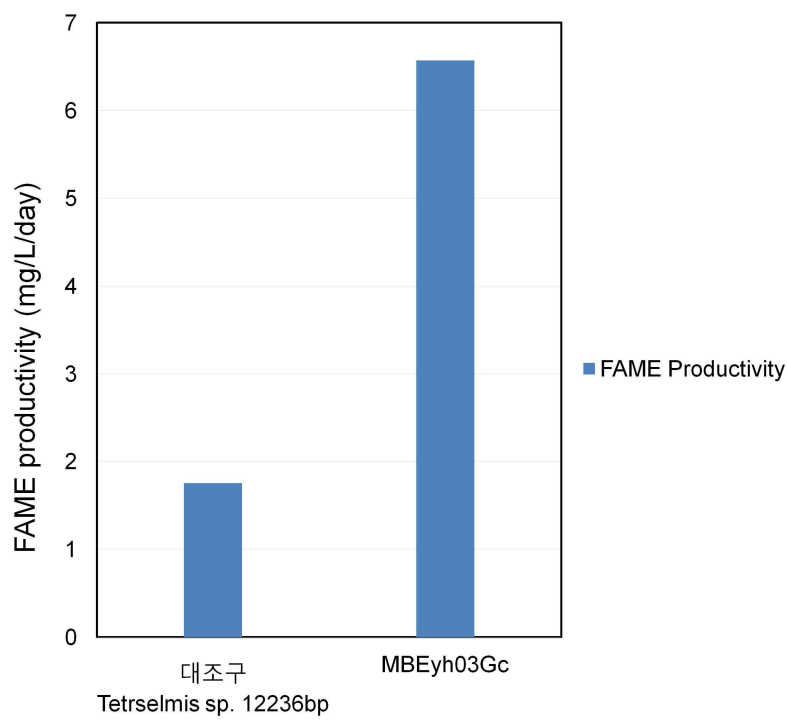
도면3a



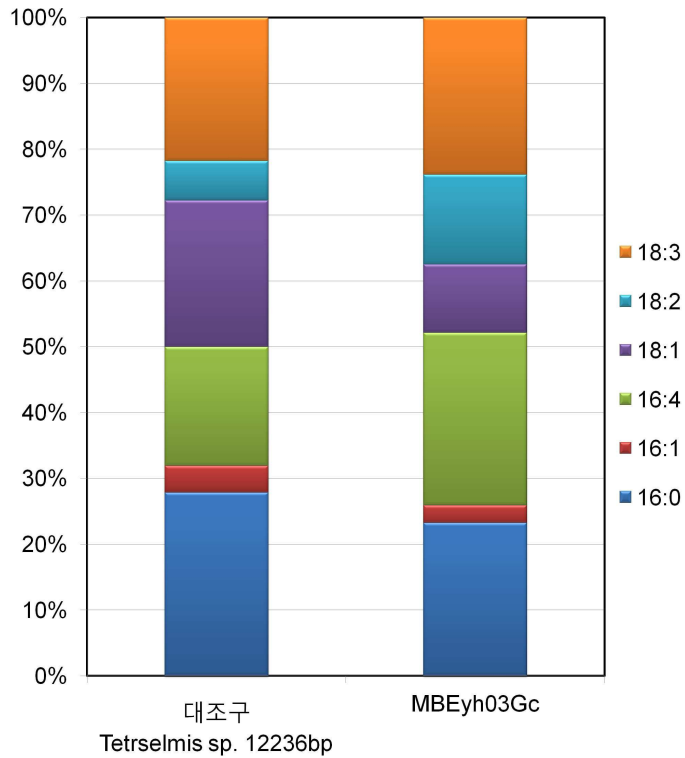
도면3b



도면4a



도면4b



서열 목록

- <110> INHA-INDUSTRY PARTNERSHIP INSTITUTE
- <120> A Novel Tetraselmis sp. MBEyh03Gc strain (KCTC 12431BP) and a method for producing biodiesel using the same
- <130> PD13-0896
- <160> 3
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 609
- <212> DNA
- <213> Tetraselmis sp. MBEyh03Gc
- <400> 1

```

tctcgtctga ctaggctcgag gtttaagttg ttttcctgct gatcacggcc aggccttgga      60
cacgcacagg aataaccgga aggctaccta cctagtgttt gcccataata gggtcctgtc      120
tggatctctg cacttcagca gacccatgcg cattgctgcc aatgagactg ccaggtccaa      180

tccgccgccc gccccggtg aagggggggg ttgggggggtt gagggggaaa accgactctg      240
aggcaggcgt gctcttgccc gaggcctcga gcgcaatatg cgttcaaaga ttcgatggtt      300
    
```

cacggaattc tgcaattcac actacgtatc gcatttcgct gcgttcttca tcgttgtaag	360
agccaagata tccgttggtg agagttgtct ttggttaggc ggtatcgac ggggcaatac	420
gcacatagct ttagacgttg ttttggtgtg gagtgtttaa ataacgccag cccagccgcc	480
cgagacgcct aagttaatag gagcgccccg tgtttgaggg cggtagagccc gactgggaac	540
gcatcccagc cgcaccaagg ccccgcgagg gtcccgggtg ggagacagaa cggtcacatg	600
gtgatgatc	609
<210> 2	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Forward Primer for 18S rDNA	
<400> 2	
tccgtaggtg aacctgcgg	19
<210> 3	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Reverse Primer for 18S rDNA	
<400> 3	
tcttccgctt attgatatgc	20