



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0028284
(43) 공개일자 2017년03월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12M 1/42 (2017.01) C12N 1/12 (2006.01)
C12P 7/64 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12M 35/04 (2013.01)
C12N 1/12 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0113417
(22) 출원일자 2016년09월02일
심사청구일자 2016년09월02일
(30) 우선권주장
1020150124957 2015년09월03일 대한민국(KR)

(71) 출원인
인하대학교 산학협력단
인천광역시 남구 인하로 100, 인하대학교 (용현동)
(72) 발명자
신화성
인천광역시 연수구 먼우금로 126, 210동 1201호 (동춘동, 현대대림2차아파트)
민슬기
인천광역시 계양구 계양문화로 142, 308동 2002호 (용종동, 초정마을두산.쌍용아파트)
조명권
인천광역시 부평구 길주로 491, 102동 1001호(청천동, 미가로아파트)
(74) 대리인
김순웅

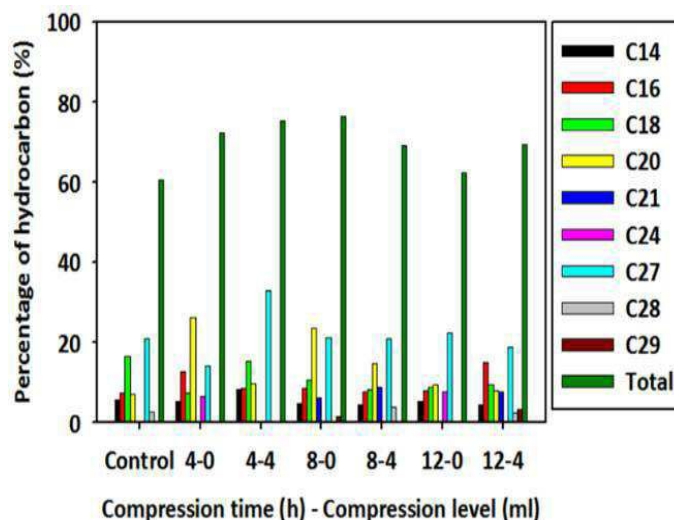
전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 발명의 명칭 미세조류 세포 자극 장치 및 이를 이용한 미세조류의 지질 생산 증대 방법

(57) 요약

본 발명은 미세조류 세포 자극 장치 및 상기 미세조류 세포 자극 장치를 이용한 미세조류의 지질 생산 증대 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 미세조류 세포 자극 장치를 이용하여 상기 미세조류 세포 자극 장치 내 폴리우레탄 비드에 압력을 가하면, 상기 폴리우레탄 비드의 복원력 및 인접한 폴리우레탄 비드 간의 접촉으로 인하여 힘의 분산이 연쇄적으로 발생하여 지속적으로 장치 내 미세조류 세포에 기계적 자극을 가하게 된다. 따라서, 다른 외부 자극을 요구하지 않아 에너지 측면에서 매우 효율적이고, 화학적 자극을 주지 않아 미세조류 세포에 안정적으로 작용한다. 특히, 본 발명의 미세조류 세포 자극 장치로 기계적 자극을 받은 미세조류 세포의 지질 생산이 증대되는 효과가 있어, 친환경 바이오 디젤 생산 방법에 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도8



(52) CPC특허분류

C12P 7/64 (2013.01)

C12N 2527/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 50882-1

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 도약연구

연구과제명 기계자극에 의한 미세조류 유용유기물 초고속 전환공정 개발

기 여 율 1/1

주관기관 인하대학교 산학협력단

연구기간 2014.11.01 ~ 2015.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

일측에 출구가 형성되고, 상기 출구를 개폐 가능하도록 형성된 제1필터를 구비하는 자극반응 탱크;
 측면이 상기 자극반응 탱크의 내주면에 접하여 상기 자극반응 탱크 내부에서 승강 운동하는 자극기 헤드를 구비하는 자극기;
 상기 자극반응 탱크 내부로 용액을 주입하거나, 상기 자극반응 탱크 내부의 용액을 흡입하여 배출시키는 펌프;
 및
 상기 자극반응 탱크 내부에 수용되는 폴리우레탄 비드를 포함하고,
 상기 자극기 헤드에는 상기 용액이 투과되는 제2필터가 구비되는 것을 특징으로 하는 미세조류 세포 자극 장치.

청구항 2

제1항에 있어서,
 상기 자극기 헤드에는 상기 자극반응 탱크 내부로 세포가 주입되도록 하는 주입구가 구비된 것을 특징으로 하는 미세조류 세포 자극 장치.

청구항 3

제1항에 있어서,
 상기 펌프에 연결되고, 내부로 상기 용액이 흐르는 관; 및
 일측은 상기 자극반응 탱크를 향하는 상기 관의 일단에 결합되고, 상기 자극기 헤드가 상승된 상태에서 타측이 상기 제2필터에 접하도록 구비되는 노즐을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 미세조류 세포 자극 장치.

청구항 4

제1항에 있어서,
 상기 펌프에 의해 상기 자극반응 탱크로부터 배출되거나, 상기 자극반응 탱크로 공급되는 용액이 저장되는 공급 탱크를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 미세조류 세포 자극 장치.

청구항 5

제1항에 있어서,
 제1필터의 공극 크기는 $800\mu\text{m}\sim 1200\mu\text{m}$ 인 것을 특징으로 하는 세포 자극 장치.

청구항 6

제3항에 있어서,
 제2필터의 공극 크기는 $3\mu\text{m}\sim 10\mu\text{m}$ 인 것을 특징으로 하는 세포 자극 장치.

청구항 7

제1항에 있어서,
 상기 폴리우레탄 비드는 폴리우레탄을 10~50%(w/v) 농도로 포함하는 것을 특징으로 하는 미세조류 세포 자극 장치.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 미세조류는 클라미도모나스 속(*Chlamydomonas sp.*)인 것을 특징으로 하는 미세조류 세포 자극 장치.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 클라미도모나스 속은 클라미도모나스 라인하르티(*Chlamydomonas reinhardtii*), 클라미도모나스 카다타(*Chlamydomonas caudate*), 클라미도모나스 모에우스(*Chlamydomonas moewusii*), 클라미도모나스 니바리스(*Chlamydomonas nivalis*) 및 클라미도모나스 오보이데(*Chlamydomonas ovoidae*)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 미세조류 세포 자극 장치.

청구항 10

- (a) 제1항의 미세조류 세포 자극 장치의 자극기를 이용하여 폴리우레탄 비드를 압축하는 단계;
- (b) 상기 미세조류 세포 자극 장치의 주입구에 미세조류의 세포를 주입하는 단계;
- (c) 상기 미세조류 세포 자극 장치의 자극기를 상승 작용시킨 후 폴리우레탄 비드가 복원되면서 미세조류 세포에 기계적 자극을 주는 단계; 및
- (d) 상기 미세조류 세포 자극 장치의 제1필터를 개방하고 자극기를 하강 작용시킨 후 회수 탱크에 상기 미세조류 세포를 회수하는 단계;를 포함하는 미세조류의 지질 생산 증대 방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 (a)의 압축은 1 내지 48시간 가하는 것을 특징으로 하는, 미세조류의 지질 생산 증대 방법.

청구항 12

제10항에 있어서,

상기 (a)의 폴리우레탄 비드는 폴리우레탄을 10 내지 50%(w/v) 농도로 포함하는 것을 특징으로 하는, 미세조류의 지질 생산 증대 방법.

청구항 13

제10항에 있어서,

상기 미세조류는 클라미도모나스 속(*Chlamydomonas sp.*)인 것을 특징으로 하는, 미세조류의 지질 생산 증대 방법.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 클라미도모나스 속은 클라미도모나스 라인하르티(*Chlamydomonas reinhardtii*), 클라미도모나스 카다타(*Chlamydomonas caudate*), 클라미도모나스 모에우스(*Chlamydomonas moewusii*), 클라미도모나스 니바리스(*Chlamydomonas nivalis*) 및 클라미도모나스 오보이데(*Chlamydomonas ovoidae*)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 미세조류의 지질 생산 증대 방법.

청구항 15

제10항에 있어서,

상기 지질은 포화 또는 불포화 지방산인 것을 특징으로 하는, 미세조류의 지질 생산 증대 방법.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 포화 또는 불포화 지방산은 C14, C16, C18, C20, C21, C24, C27, C28 및 C29으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 사슬 길이를 갖는 지방산인 것을 특징으로 하는, 미세조류의 지질 생산 증대 방법.

청구항 17

- (a) 제1항의 미세조류 세포 자극 장치의 자극기를 이용하여 폴리우레탄 비드를 압축하는 단계;
- (b) 상기 미세조류 세포 자극 장치의 주입구에 미세조류의 세포를 주입하는 단계;
- (c) 상기 미세조류 세포 자극 장치의 자극기를 상승 작용시킨 후 폴리우레탄 비드가 복원되면서 미세조류 세포에 기계적 자극을 주는 단계; 및
- (d) 상기 미세조류 세포 자극 장치의 제1필터를 개방하고 자극기를 하강 작용시킨 후 회수 탱크에 상기 미세조류 세포를 회수하는 단계;를 포함하는 지질 생산이 증대된 미세조류의 제조 방법.

청구항 18

제17항에 있어서,

상기 미세조류는 비편모조류화(deflagellation)된 것을 특징으로 하는, 지질 생산이 증대된 미세조류의 제조 방법.

청구항 19

제17항의 제조 방법으로 지질 생산이 증대된 미세조류.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 미세조류 세포 자극 장치 및 상기 미세조류 세포 자극 장치를 이용한 미세조류의 지질 생산 증대 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 미세조류(microalgae)는 크기가 50 μm 이하의 단세포 조류이다. 자연계의 먹이사슬에서 최하위에 위치하기 때문에 광합성을 통해 유기물을 생산하는 독립영양생물이다. 종에 따라 차이는 있지만 일반적으로 섬유질을 많이 포함하고 있는 세포벽과 다양한 당류를 포함하는 물질로 채워진 내부 추출물로 나눌 수 있다. 일부 종에 함유되어 있는 지질은 식물유와 매우 유사하여 이를 생물연료로 만드는데 매우 적합하며, 상기 지질의 함량이 건조물의 80%까지 이르는 종도 있다. 미세조류는 배양시설 등과 같은 폐쇄된 생산 체계에서 자동으로 대량 배양이 가능하다. 또한, 상기 미세조류의 지질을 수득하기 위하여, 배양 조건 또는 시스템은 매우 중요하다.

[0003] 기존의 대용량 기계적 자극(mechanical stress)을 통한 배양시스템에서는 주로 임펠러(impeller)의 스트링(stirring)을 이용한 방식이 이용되어왔다. 또한, 최근에는 압축 로딩 시스템(compressive loading system), 세로길이 신장 시스템(longitudinal stretch system) 및 기질 팽창 시스템(substrate distention system)과 같은 다양한 방식의 대용량 기계적 자극 시스템이 개발되고 있다. 그러나, 스트링의 경우, 유체 자극(fluid stress)을 주기 위한 임펠러 회전 동력 소비가 심해 에너지적 측면에서 비효율적이며, 리액터(reactor) 내부 위치에 따른 자극 정도(임펠러로부터 멀어질수록 자극 강도가 감소)가 다르기 때문에, 공간적으로 일정한 스트레스를 주지 못한다는 한계점을 갖고 있다. 또한, 세로길이 신장 시스템 또는 기질 팽창 시스템의 경우, 부착세포에만 적용된다는 한계점을 갖고 있으며, 2차원적인 면적단위 자극 방식이므로, 많은 양의 세포에 자극을 주기 위해서 공간적 소비가 심하다는 공간적 비효율성을 가지고 있다.

[0004] 상기와 같은 문제를 해결하기 위하여, 본 발명자들은 기계적 자극을 이용하는 배양 시스템을 이용하여 미세조류의 지질 생산을 증대시키는 방법을 연구하던 중, 폴리우레탄 비드를 이용하여 미세조류에 기계적 자극을 주는 미세조류 세포 자극 장치를 제작하였고, 상기 장치에 의해 폴리우레탄 비드에 압력이 가해지고 압축된 폴리우레탄 비드가 복원되면서 미세조류의 세포에 기계적 자극을 주게 되면, 미세조류의 지질 생산량이 증가됨을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0005] 본 발명의 목적은 미세조류 세포 자극 장치를 제공하는 것이다.
- [0006] 또한 본 발명의 목적은 미세조류의 지질 생산 증대 방법을 제공하는 것이다.
- [0007] 또한 본 발명의 목적은 지질 생산이 증대된 미세조류의 제조 방법을 제공하는 것이다.
- [0008] 또한 본 발명의 목적은 상기 제조 방법으로 지질 생산이 증대된 미세조류를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0009] 상기와 같은 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 일측에 출구가 형성되고, 상기 출구를 개폐 가능하도록 형성된 제1필터를 구비하는 자극반응 탱크; 측면이 상기 자극반응 탱크의 내주면에 접하여 상기 자극반응 탱크 내부에서 승강 운동하는 자극기 헤드를 구비하는 자극기; 상기 자극반응 탱크 내부로 용액을 주입하거나, 상기 자극반응 탱크 내부의 용액을 흡입하여 배출시키는 펌프; 및 상기 자극반응 탱크 내부에 수용되는 폴리우레탄 비드를 포함하고, 상기 자극기 헤드에는 상기 용액이 투과되는 제2필터가 구비되는 것을 특징으로 하는 미세조류 세포 자극 장치를 제공한다.
- [0010] 또한 본 발명은, (a) 상기 미세조류 세포 자극 장치의 자극기를 이용하여 폴리우레탄 비드를 압축하는 단계; (b) 상기 미세조류 세포 자극 장치의 주입구에 미세조류의 세포를 주입하는 단계; (c) 상기 미세조류 세포 자극 장치의 자극기를 상승 작용시킨 후 폴리우레탄 비드가 복원되면서 미세조류 세포에 기계적 자극을 주는 단계; 및 (d) 상기 미세조류 세포 자극 장치의 제1필터를 개방하고 자극기를 하강 작용시킨 후 회수 탱크에 상기 미세조류 세포를 회수하는 단계;를 포함하는 미세조류의 지질 생산 증대 방법을 제공한다.
- [0011] 또한 본 발명은, (a) 상기 미세조류 세포 자극 장치의 자극기를 이용하여 폴리우레탄 비드를 압축하는 단계; (b) 상기 미세조류 세포 자극 장치의 주입구에 미세조류의 세포를 주입하는 단계; (c) 상기 미세조류 세포 자극 장치의 자극기를 상승 작용시킨 후 폴리우레탄 비드가 복원되면서 미세조류 세포에 기계적 자극을 주는 단계; 및 (d) 상기 미세조류 세포 자극 장치의 제1필터를 개방하고 자극기를 하강 작용시킨 후 회수 탱크에 상기 미세조류 세포를 회수하는 단계;를 포함하는 지질 생산이 증대된 미세조류의 제조 방법을 제공한다.
- [0012] 또한 본 발명은, 상기 제조 방법으로 지질 생산이 증대된 미세조류를 제공한다.

발명의 효과

- [0013] 본 발명에 따른 미세조류 세포 자극 장치를 이용하여 상기 미세조류 세포 자극 장치 내 폴리우레탄 비드에 압력을 가하면, 상기 폴리우레탄 비드의 복원력 및 인접한 폴리우레탄 비드 간의 접촉으로 인하여 힘의 분산이 연쇄적으로 발생하여 지속적으로 장치 내 미세조류 세포에 기계적 자극을 가하게 된다. 따라서, 다른 외부 자극을 요구하지 않아 에너지 측면에서 매우 효율적이고, 화학적 자극을 주지 않아 미세조류 세포에 안정적으로 작용한다. 특히, 본 발명의 미세조류 세포 자극 장치로 기계적 자극을 받은 미세조류 세포의 지질 생산이 증대되는 효과가 있어, 친환경 바이오 디젤 생산 방법에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0014] 도 1은 본 발명의 바람직한 실시예에 따른 세포 자극 장치의 개략도이다.
- 도 2의 a는 자극된 클라미도모나스 라인하르티의 지질 생산 증대 과정을 모식화한 도이다. b는 본 발명의 세포 자극 장치의 압축 단계, 탈-압축 단계 및 회수 단계를 모식화한 도이다.
- 도 3의 a는 폴리우레탄 함량(%) (w/v)에 따른 폴리우레탄 비드의 형태를 나타낸 도이다. b는 각 폴리우레탄 함량(%) (w/v)에 따른 비드의 지름을 나타낸 도이다. c는 30% (w/v) 폴리우레탄 비드의 표면 및 단면적 형태를 나타낸 도이다.
- 도 4의 a는 자극 횟수에 따른 폴리우레탄 비드의 복원력 정도를 확인한 도이다. b는 클라미도모나스 라인하르티를 자극한 비드의 내부에 세포가 침투했는지 확인하기 위하여 비드 내부 액체의 흡광도를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 5의 a 및 b는 대조군 및 자극된 클라미도모나스 라인하르티의 칼슘 유입을 확인한 도이다. c는 자극 12시간 및 24시간의 클라미도모나스 라인하르티의 세포 크기를 확인한 도이다. d는 대조군 및 자극된 클라미도모나스 라인하르티의 Mat3 및 E2F1의 mRNAs 발현 정도를 확인한 도이다.

도 6의 a 및 b는 자극 시간 및 압력 정도에 따른 클라미도모나스 라인하르티의 지방 소립의 증가를 확인한 도이다.

도 7의 a 및 b는 자극 시간에 따른 단세포 또는 총세포의 지방 생산 정도를 확인한 도이다(블랙 바는 대조군, 회색 바는 자극된 세포를 의미함)

도 8은 대조군 및 자극된 클라미도모나스 라인하르티의 지질 함량을 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 9는 대조군과 비교하여 각 시간 조건에 따른 압축 과정 및 탈-압축된 클라미도모나스 라인하르티의 ACCase, DGAT 및 LPAAT의 mRNA 발현 정도를 확인한 도이다.

도 10의 a 및 b는 클라미도모나스 라인하르티 세포의 직접적 자극 조건을 모식화한 도이다.

도 11은 대조군과 비교하여 각 시간 조건에 따른 압축 과정 및 탈-압축된 클라미도모나스 라인하르티의 아포토시스 값(%)을 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0015] 상기와 같은 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 일측에 출구가 형성되고, 상기 출구를 개폐 가능하도록 형성된 제1필터를 구비하는 자극반응 탱크; 측면이 상기 자극반응 탱크의 내주면에 접하여 상기 자극반응 탱크 내부에서 승강 운동하는 자극기 헤드를 구비하는 자극기; 상기 자극반응 탱크 내부로 용액을 주입하거나, 상기 자극반응 탱크 내부의 용액을 흡입하여 배출시키는 펌프; 및 상기 자극반응 탱크 내부에 수용되는 폴리우레탄 비드를 포함하고, 상기 자극기 헤드에는 상기 용액이 투과되는 제2필터가 구비되는 것을 특징으로 하는 미세조류 세포 자극 장치를 제공한다.
- [0016] 본 발명에서 용어 "폴리우레탄"은 알코올기와 아이소사이안산기의 결합으로 만들어진 우레탄결합으로 결합된 고분자 화합물의 총칭이다. 폴리우레탄은 거품 구조를 가지기 때문에 탄성이 있고 견고하며 가벼운 특성을 가진다. 또한, 화학약품에 잘 견디는 특성을 가지고 있으며, 신축성이 좋아 고무의 대체 물질로도 사용된다.
- [0017] 도 1은 본 발명의 바람직한 실시예에 따른 세포 자극 장치의 개략도이다.
- [0018] 도 2를 참고하여 본 발명의 바람직한 실시예에 따른 미세조류 세포 자극 장치(100)를 설명한다.
- [0019] 본 발명의 바람직한 실시예에 따른 미세조류 세포 자극 장치(100)는 자극반응 탱크(110), 자극기(120), 펌프(130), 공급 탱크(140), 회수 탱크(150) 및 폴리우레탄 비드(160)를 포함한다.
- [0020] 자극반응 탱크(110)는 일측에 출구가 형성되고, 상기 출구를 개폐 가능하도록 형성된 제1필터(112)를 구비한다. 이러한 자극반응 탱크(110)는 원통형 등의 직선형 관 모양으로 형성된다.
- [0021] 제1필터(112)는 자극반응 탱크(110)의 출구에 배치되어 자극기(120)에 의해 상부가 폐쇄된 자극반응 탱크(110)의 내부를 개폐시키는 역할을 한다. 이러한 제1필터(112)는 스테인리스 스틸 멤브레인 필터로 구현될 수 있으며, 제1필터(112)의 공극 크기는 800 μ m~1200 μ m로 형성하여 자극반응 탱크(110) 내부에 수용되는 폴리우레탄 비드(160)를 걸러낼 수 있도록 한다.
- [0022] 자극기(120)은 일단에 측면이 자극반응 탱크(110)의 내주면에 접하여 자극반응 탱크(110) 내부에서 승강운동하는 자극기 헤드(122)를 구비한다.
- [0023] 자극기 헤드(122)에는 미세조류 세포(C)의 배양을 위한 배양액 등의 용액이 투과되는 제2필터(124)가 구비되는데, 제2필터(124)의 공극 크기는 3 μ m~10 μ m로 형성하여 펌프(130)를 이용한 용액의 배출 시 배출되는 용액과 함께 미세조류 세포(C)가 자극반응 탱크(110)의 외부로 누출되는 것을 방지한다.
- [0024] 또한, 자극기 헤드(122)에는 자극반응 탱크(110)와 자극기 헤드(122)에 의해 둘러 싸여진 자극반응 탱크(110)의 내부공간에 미세조류 세포(C)를 주입하여 접종시키기 위한 주입구(126)가 구비된다.
- [0025] 펌프(130)는 자극반응 탱크(110) 내부로 배양액 등의 용액을 주입하거나, 자극반응 탱크(110) 내부의 용액을 흡입하여 공급 탱크(140)로 배출시킨다.

- [0026] 이때, 펌프(130)에는 내부로 용액이 흐를 수 있도록 형성되는 관(134)이 연결되고, 자극반응 탱크(110)를 향하는 관(134)의 일단에는 노즐(132)이 결합된다.
- [0027] 이때, 노즐(132)은 관(134)에 결합되지 않은 타측이 자극기 헤드(122)가 상승된 상태에서 제2필터(124)에 접하도록 구비된다.
- [0028] 공급 탱크(140)는 펌프(130)에 의해 자극반응 탱크(110)로부터 배출되거나, 자극반응 탱크(110)로 공급되는 용액이 저장된다.
- [0029] 회수 탱크(150)는 제1필터(112)가 개방된 상태에서 용액과 함께 제1필터(112)를 투과하여 배출된 미세조류 세포(C)가 수용되는 부분이다.
- [0030] 폴리우레탄 비드(160)는 탄성을 가지는 재질로 형성되고, 자극반응 탱크(110) 내부에 수용되어 자극기 헤드(122)에 의해 압력을 받아 변형되면서 함께 자극반응 탱크(110)에 수용된 미세조류 세포(C)에 물리적 자극을 가하는 역할을 한다.
- [0031] 상기 폴리우레탄 비드는 폴리우레탄을 10 내지 50%(w/v) 농도로 포함될 수 있고, 더욱 바람직하게는 25 내지 30%(w/v) 농도의 폴리우레탄 비드이다.
- [0032] 상기 미세조류는 클라미도모나스 속(*Chlamydomonas sp.*)으로, 상기 클라미도모나스 속은 클라미도모나스 라인하르티(*Chlamydomonas reinhardtii*), 클라미도모나스 카다타(*Chlamydomonas caudate*), 클라미도모나스 모에우스(*Chlamydomonas moewusii*), 클라미도모나스 니바리스(*Chlamydomonas nivalis*) 및 클라미도모나스 오보이드(*Chlamydomonas ovoidae*)로 이루어진 군에서 선택된 1종이고, 바람직하게는 클라미도모나스 라인하르티(*Chlamydomonas reinhardtii*)이나, 이에 제한되지 않는다.
- [0033] 도 2는 본 발명의 바람직한 실시예에 따른 세포 자극 장치를 이용하여 세포에 자극을 가하는 과정을 설명하기 위한 도면이다.
- [0034] 이하, 도 2를 참고하여 상술한 본 발명의 세포 자극 장치(100)를 이용하여 세포에 물리적 자극을 가하는 과정을 설명한다.
- [0035] 먼저, 도 2의 ①과 같이, 자극반응 탱크(110) 내부에 다수의 폴리우레탄 비드(160)와 배양액 등의 용액을 채우고, 제1필터(112)는 폐쇄 상태(OFF)가 되도록 하여 자극반응 탱크(110) 내부의 충전물들이 외부로 누출되지 않도록 한다.
- [0036] 이후, 도 2의 ②와 같이, 제1필터(112)의 폐쇄 상태(OFF)가 유지된 상태에서, 자극기(120)를 하강시켜 폴리우레탄 비드(160)를 압축 시키고, 자극반응 탱크(110) 내부의 용액은 제2필터(124)를 통해 자극기 헤드(122)의 상부 공간으로 배출되어 공급 탱크(140)에 이동된다.
- [0037] 이후, 도 2의 ③과 같이, 제1필터(112)의 폐쇄 상태(OFF)가 유지된 상태에서, 주입구(126)에 미세조류 세포(C)를 주입한다.
- [0038] 이후, 도 2의 ④와 같이, 제1필터(112)의 폐쇄 상태(OFF)가 유지된 상태에서, 자극기(120)를 상승시켜 폴리우레탄 비드(160)의 복원력 및 탄성력을 이용하여 미세조류 세포(C)에 기계적 자극이 가하도록 한다. 이때, 공급 탱크(140)의 용액이 펌프(130)를 이용하여 자극반응 탱크(110)으로 이동한다.
- [0039] 이후, 도 2의 ⑤와 같이, 제1필터(112)의 개방 상태(ON)가 유지된 상태에서, 기계적 자극이 가해진 미세조류 세포(C)가 회수 탱크(150)로 유입되도록 하고, 폴리우레탄 비드(160)들은 제1필터(112)에 의해 걸려져서 자극반응 탱크(110) 내부에 잔류하게 된다.
- [0041] 또한 본 발명은, (a) 상기 미세조류 세포 자극 장치의 자극기를 이용하여 폴리우레탄 비드를 압축하는 단계; (b) 상기 미세조류 세포 자극 장치의 주입구에 미세조류의 세포를 주입하는 단계; (c) 상기 미세조류 세포 자극 장치의 자극기를 상승 작용시킨 후 폴리우레탄 비드가 복원되면서 미세조류 세포에 기계적 자극을 주는 단계; 및 (d) 상기 미세조류 세포 자극 장치의 제1필터를 개방하고 자극기를 하강 작용시킨 후 회수 탱크에 상기 미세조류 세포를 회수하는 단계;를 포함하는 미세조류의 지질 생산 증대 방법을 제공한다.
- [0042] 상기 미세조류의 지질 생산 증대 방법은 세포 자극 장치의 자극기를 이용하는 것으로, 이하, 도 2를 참고하여 상술한 본 발명의 세포 자극 장치(100)를 이용하여 세포에 물리적 자극을 가하는 과정을 포함하는 것으로, 과도

한 기재 및 중복 제거를 위하여 생략한다.

- [0043] 본 발명에서 용어 "기계적 자극"은 기계나 기구 따위를 사용하여 생물에 작용함으로써 어떤 반응을 일으키게 하는 일을 의미하며, 예컨대, 본 발명에서는 압축된 폴리우레탄이 복원되어 세포에 가하는 자극을 의미한다.
- [0044] 상기 (a)의 압축은 1 내지 48시간 가하는 것이나, 바람직하게는 1 내지 30시간, 더욱 바람직하게는 4 내지 24시간이며, 이에 제한되지 않는다.
- [0045] 상기 폴리우레탄 비드는 폴리우레탄을 10 내지 50%(w/v) 농도로 포함될 수 있고, 더욱 바람직하게는 25 내지 30%(w/v) 농도의 폴리우레탄 비드이다.
- [0046] 상기 미세조류는 클라미도모나스 속(*Chlamydomonas* sp.)으로, 상기 클라미도모나스 속은 클라미도모나스 라인하르티(*Chlamydomonas reinhardtii*), 클라미도모나스 카다타(*Chlamydomonas caudate*), 클라미도모나스 모에우스(*Chlamydomonas moewusii*), 클라미도모나스 니발리스(*Chlamydomonas nivalis*) 및 클라미도모나스 오보이드(*Chlamydomonas ovoidae*)로 이루어진 군에서 선택된 1종이고, 바람직하게는 클라미도모나스 라인하르티(*Chlamydomonas reinhardtii*)이나, 이에 제한되지 않는다.
- [0047] 상기 지질은 포화 또는 불포화 지방산일 수 있고, C14, C16, C18, C20, C21, C24, C27, C28 및 C29으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 사슬 길이를 갖는 지방산이며, 이에 제한되지 않는다.
- [0049] 또한 본 발명은, (a) 상기 미세조류 세포 자극 장치의 자극기를 이용하여 폴리우레탄 비드를 압축하는 단계; (b) 상기 미세조류 세포 자극 장치의 주입구에 미세조류의 세포를 주입하는 단계; (c) 상기 미세조류 세포 자극 장치의 자극기를 상승 작용시킨 후 폴리우레탄 비드가 복원되면서 미세조류 세포에 기계적 자극을 주는 단계; 및 (d) 상기 미세조류 세포 자극 장치의 제1필터를 개방하고 자극기를 하강 작용시킨 후 회수 탱크에 상기 미세조류 세포를 회수하는 단계;를 포함하는 미세조류의 지질 생산 증대 방법을 제공한다.
- [0050] 또한 본 발명은, (a) 상기 미세조류 세포 자극 장치의 자극기를 이용하여 폴리우레탄 비드를 압축하는 단계; (b) 상기 미세조류 세포 자극 장치의 주입구에 미세조류의 세포를 주입하는 단계; (c) 상기 미세조류 세포 자극 장치의 자극기를 상승 작용시킨 후 폴리우레탄 비드가 복원되면서 미세조류 세포에 기계적 자극을 주는 단계; 및 (d) 상기 미세조류 세포 자극 장치의 제1필터를 개방하고 자극기를 하강 작용시킨 후 회수 탱크에 상기 미세조류 세포를 회수하는 단계;를 포함하는 지질 생산이 증대된 미세조류의 제조 방법을 제공한다.
- [0051] 상기 미세조류는 비편모조류화(deflagellation)될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0052] 본 발명에 있어서, "비편모조류화(deflagellation)"는 미세조류에 운동성을 갖게하는 편모가 존재하는데, 해당 편모가 떨어져 나가는 현상을 의미한다.
- [0053] 또한 본 발명은, 상기 제조 방법으로 지질 생산이 증대된 미세조류를 제공한다.
- [0055] 본 발명의 일실시예에 있어서, 본 발명의 자극 장치를 이용 시, 압축 단계, 탈-압축 단계 및 회수 단계를 거쳐 클라미도모나스 라인하르티 세포에 기계적 자극을 효과적으로 가하게 됨을 확인하였다. 또한, 상기 자극 장치 내 30%(w/v) 폴리우레탄 비드를 이용 시, 상기 비드는 우수한 탄성력, 복원력 및 강인성이 존재하여 효과적으로 세포에 자극을 가하고, 자극 시간은 1 내지 24시간 자극이 최적임을 확인하였다.
- [0056] 상기 일련의 실험을 통하여, 본 발명의 자극 장치를 이용 시, 압축 단계, 탈-압축 단계 및 회수 단계를 거쳐 클라미도모나스 라인하르티 세포에 기계적 자극을 효과적으로 가하게 됨을 확인하였다. 또한, 상기 자극 장치 내 30%(w/v) 폴리우레탄 비드를 이용 시, 상기 비드는 우수한 탄성력, 복원력 및 강인성이 존재하여 효과적으로 세포에 자극을 가하고, 자극 시간은 0 내지 24시간 자극이 최적임을 확인하였다.
- [0057] 또한, 본 발명의 자극 장치를 이용하여 자극된 클라미도모나스 라인하르티 세포는 멤브레인 왜곡(membrane distortion)이 유도되어 칼슘 유입이 대조군 세포보다 증가되어 비편모조류화(deflagellation) 됨을 확인하였다. 또한, 생리적 변화와 관련된 Mat3 mRNAs 발현이 증가되어, 생리적 변화가 발생됨을 확인하였고, 자극 되지 않은 대조군과 비교하여 세포의 크기가 더 커짐을 확인하였다. 또한, 지질 관련된 ACCase, DGAT 및 LPAAT의 mRNA 발현이 증가되고, 자극된 클라미도모나스 라인하르티는 C14, C16, C18, C20, C21, C24, C27, C28 및 C29의 사슬 길이를 갖는 지방산을 함유하고, 대조군과 비교하여 다불포화지방산(Polyunsaturated fatty

acid, PUFA)이 발생하는 것을 확인하였고, 이에 따라, 압축 스트레스에 의해 클라미도모나스 라인하르티 세포 내에 지질 구성이 변화하는 것을 확인하였다.

[0058] 따라서, 본 발명의 자극 장치를 이용 시, 다른 외부 자극을 요구하지 않아 에너지 측면에서 매우 효율적이고, 화학적 자극을 주지 않아 미세조류 세포에 안정적으로 작용한다. 특히, 본 발명의 미세조류 세포 자극 장치로 기계적 자극을 받은 미세조류 세포의 지질 생산이 증대되는 효과가 있어, 친환경 바이오 디젤 생산 방법에 유용하게 이용될 수 있다.

[0060] 이하, 실시예를 통해 본 발명을 자세히 설명하도록 한다. 하기 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0062] 실험예 1. 미세조류 세포 자극 장치 제조 및 실험 방법

[0064] 1-1. 미세조류 세포 자극 장치 제조

[0065] 본 발명의 미세조류 세포 자극 장치(100)는 도 1에 나타내었으며, 일반적으로 자극반응 탱크와 같이 세포에 자극을 가하는 펌핑 원리를 이용하였으며, 구체적으로, 자극기(120), 펌프(130), 공급 탱크(140), 회수 탱크(150) 및 폴리우레탄 비드(160)를 포함하도록 제작하였다. 보다 구체적으로, 자극반응 탱크(110)는 일측에 출구가 형성되고, 상기 출구를 개폐 가능하도록 형성된 제1필터(112)를 구비하였다. 상기 자극반응 탱크(110)는 원통형 등의 직선형 관 모양으로 형성하도록 하였다. 제1필터(112)는 자극반응 탱크(110)의 출구에 배치되어 자극기(120)에 의해 상부가 폐쇄된 자극반응 탱크(110)의 내부를 개폐시키는 역할을 하도록 하였다. 상기 제1필터(112)는 스테인리스 스틸 멤브레인 필터로 구현될 수 있으며, 제1필터(112)의 공극 크기는 $800\mu\text{m}$ ~ $1200\mu\text{m}$ 로 형성하여 자극반응 탱크(110) 내부에 수용되는 폴리우레탄 비드(160)를 걸러낼 수 있도록 제작하였다.

[0066] 또한, 자극기(120)은 일단에 측면이 자극반응 탱크(110)의 내주면에 접하여 자극반응 탱크(110) 내부에서 승강 운동하는 자극기 헤드(122)를 구비하도록 하고, 상기 자극기 헤드(122)에는 미세조류 세포(C)의 배양을 위한 배양액 등의 용액이 투과되는 제2필터(124)가 구비되는데, 제2필터(124)의 공극 크기는 $3\mu\text{m}$ ~ $10\mu\text{m}$ 로 형성하여 펌프(130)를 이용한 용액의 배출 시 배출되는 용액과 함께 미세조류 세포(C)가 자극반응 탱크(110)의 외부로 누출되는 것을 방지하게 제작하였다. 또한, 자극기 헤드(122)에는 자극반응 탱크(110)와 자극기 헤드(122)에 의해 둘러싸여진 자극반응 탱크(110)의 내부공간에 세포(C)를 주입하여 접종시키기 위한 주입구(126)를 구비하도록 제작하였다.

[0067] 또한, 펌프(130)는 자극반응 탱크(110) 내부로 배양액 등의 용액을 주입하거나, 자극반응 탱크(110) 내부의 용액을 흡입하여 공급 탱크(140)로 배출시키게 하는 양방향 펌프이다. 이때, 상기 펌프(130)에는 내부로 용액이 흐를 수 있도록 형성되는 관(134)이 연결되고, 자극반응 탱크(110)를 향하는 관(134)의 일단에는 노즐(132)이 결합된다. 또한, 상기 노즐(132)은 관(134)에 결합되지 않은 타측이 자극기 헤드(122)가 상승된 상태에서 제2필터(124)에 접하도록 제작하였다.

[0068] 또한, 공급 탱크(140)는 펌프(130)에 의해 자극반응 탱크(110)로부터 배출되거나, 자극반응 탱크(110)로 공급되는 용액이 저장되도록 제작하였다.

[0069] 또한, 회수 탱크(150)는 제1필터(112)가 개방된 상태에서 용액과 함께 제1필터(112)를 통과하여 배출된 미세조류 세포(C)가 수용되는 부분이다.

[0070] 또한, 폴리우레탄 비드(160)는 30% (w/v) 농도의 폴리우레탄 비드를 이용하여, 자극반응 탱크(110) 내부에 수용되어 자극기 헤드(122)에 의해 압력을 받아 변형되면서 함께 자극반응 탱크(110)에 수용된 미세조류 세포(C)에 물리적 자극을 가하는 역할을 하도록 제작하였다.

[0071] 상기 미세조류 세포 자극 장치를 이용하여, 클라미도모나스 라인하르티 세포에 자극을 가하는 과정은 도 2에 나타내었다. 구체적으로, 자극반응 탱크(110) 내부에는 30% (w/v) 농도의 제형된 폴리우레탄 비드(160)로 가득 채워져 있으며, 도 2의 과정을 따라서 압축, 탈-압축 및 회수 단계를 진행하였다.

- [0072] 상기 압축 단계의 경우, 자극기(120)에 압력을 가하여 자극반응 탱크(110) 내부를 압축하는 동시에 노즐(132)을 통해 일정량의 배지를 배출시켰다. 폴리우레탄 비드(160)가 완전히 압축된 후에, 주입구(126)를 통해 세포(C)가 주입된다. 상기 과정에서, 배지 배출과 함께 세포 손실이 발생할 가능성이 있기 때문에 반드시 비드 압축이 완전히 끝난 이후에 세포 주입을 진행하였다. 또한, 상기 과정에서, 압축에 의해 세포가 회수 탱크(150)로 빠져나가지 않도록 하단부의 1000 μm 의 제1필터(112)를 off 상태로 두었다. 이때, 30% (w/v) 농도의 폴리우레탄 비드(160)는 압축되어 있는 상태이며, 원래의 모양을 복원하려는 힘으로 인해 지속적으로 주변 세포에 기계적 자극을 가하게 된다. 또한, 비드간의 접촉으로 인한 힘의 분산이 발생한다. 이러한 힘의 분산이 연쇄적으로 일어나면서 전체 비드가 동일하게 압축되며, 결과적으로 공간적으로 일정한 기계적 자극을 전체 세포에 가하게 된다.
- [0073] 탈-압축 단계의 경우, 자극기(120)를 승강하면서, 펌프(130)를 통해 공급 탱크(140) 내의 배지를 추가적으로 자극반응 탱크(110)에 주입하였다. 이때, 상기 압축된 30% (w/v) 농도의 폴리우레탄 비드(160)는 복원력으로 인하여, 다시 전체 세포(C)에 기계적 자극을 가하게 된다.
- [0074] 회수 단계의 경우, 상기 탈-압축에 의하여 충분히 공간이 확보된 상태에서 공급된 배지에 의해 뭉친 폴리우레탄 비드(160)가 복원되어 완전히 풀린 뒤 하단부의 off 상태였던 제1필터(112)를 on 시키고, 상단부의 노즐(132)을 막은 상태에서 자극기(120)에 압력을 가하여 회수 탱크(150)를 통해 세포(C)를 회수하였다.
- [0076] 1-2. 폴리우레탄 비드(Polyurethane bead) 제작
- [0077] 폴리우레탄(Polyurethane, PU)은 탄성체 고분자(elastomeric polymer)로서 비드의 재료로 사용하였다. 폴리우레탄 템플릿을 N,N-dimethylformamide (DMF)에 녹여 30%(w/v) 폴리우레탄 용액을 만든 후, 밤새 완전히 녹이고 플라스틱 시린지에 로딩하여 22G 니들(needle)과 연결하였다. 상기 시린지 세트를 시린지 펌프(KD Scientific)에 설치하고 유량을 3 ml/h로 설정하였다. 상기 시린지에서 구 형태로 떨어진 폴리우레탄 비드는 비커에 담겨 있는 2차 증류수에 모았으며, syringe 끝으로부터 증류수까지의 낙하 높이는 9 cm로 유지하여, 폴리우레탄이 20% (w/v), 25% (w/v), 30% (w/v), 35% (w/v) 및 40% (w/v)로 함유된 폴리우레탄 비드를 제형하였다. 상기 제형된 폴리우레탄 비드 내부의 잔여 DMF를 제거하기 위하여 95% 에탄올(Samshun pure chemical)에 밤새 담가두었다. 이후 2차 증류수로 3회 세척하였으며, 최종적으로 비드를 TAP배지에 밤새 동안 담가두었다. 상기 과정에서 비드에 압력을 가하여 내부에 흡수된 용액까지 배출시키며 세척하였고, 비드의 탄성력을 높이고 일정 압력에 대한 복원력을 갖도록 하였다.
- [0078] 상기 제형된 폴리우레탄 비드의 형태를 관찰하기 위하여 SEM(Scanning electron microscope)(Hitachi S-4200)을 이용하였다. 데시케이터(Desiccator)에 밤새 보관해둔 각 비드를 카본 테잎을 이용하여 콜렉터에 부착하였다. SEM을 찍기 전에, 각 비드를 Pt sputter를 이용하여 180초간 코팅하였다. 최종적으로 10kV 가속 전압에서 SEM 이미지를 획득하였다. 또한, 압축 단계 또는 탈-압축된 단계에서의 각 비드의 탄성력을 확인하기 위하여, 각 농도의 비드의 복원 정도를 10분 간격으로 관찰하였다. 또한, 마이크로미터를 이용하여 비드의 압축 과정 및 시간에 따른 각 조건의 비드의 지름 변화를 측정하였다.
- [0080] 1-3. 클라미도모나스 라인하르티(*Chlamydomonas reinhardtii*) 배양
- [0081] 야생형 클라미도모나스 라인하르티 CC-620을 18ml TAP media(Gibco, USA), pH 7.2의 조건인 플라스크에 접종하고, 이를 5 % CO₂ 조건을 유지시키며 23도, 120 rpm으로 진탕배양기로 배양하였다. 빛은 OSRAM DULUX L FPL36EX-D lamps로 제공하였으며, 빛의 세기는 300 $\mu\text{m} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 으로 유지시켰다.
- [0082] 세포 성장 및 분화의 동시화(Synchronization)를 확인하기 위하여, 광 및 암 기간의 조건 변화(12 h / 12 h)를 진행하였다. 3번째 사이클부터 세포의 동시화가 확인되었으며, 상기 세포의 동시화 여부는 동시화된 배양 과정에서 단위시간당 세포 광학 밀도를 X-ma 1000 분광광도계를 통해 측정하여 성장 곡선 커브를 그려 확인하였다. 성장 커브 변화는 3번째 암/광 사이클 동안 모니터링하였다. 4번째 광 기간이 시작될 때, 배양 희석을 통해 동조 세포(Synchronous cell) 접종농도(2×10^6 cell/ml)를 맞추어 접종할 접종액을 준비하였다. 상기 접종액을 비스트레스 반응기와 유체 농화 스트레스 반응기(fluid shear stress reactor)에 각각 접종하였다.

- [0084] 1-4. 클라미도모나스 라인하르티(*Chlamydomonas reinhardtii*)의 생존력 및 아포토시스(apoptosis)
- [0085] 상기 1-3의 반응기로부터 얻은 각 샘플을 TAP media을 포함하는 1 mM sytox Green (Molecular Probes)를 통해 10분간 실온에서 염색하였다. 각 샘플을 confocal laser microscope(LSM 510 META)를 이용하여 촬영하였으며, 488 nm (Ar-laser)/505-530 nm(여기/방출)에서 live cell을 543nm (HeNe-laser)/560 nm (여기/방출)에서 사멸된 세포를 촬영하였다. 또한, Dual fluorescence image는 ZEN 2009 light Edition software(Carl Zeiss)를 통해 병합하였으며, 최소 500개 이상의 세포를 $\times 100$ 배율에서 무작위로 설정하여 클라미도모나스 라인하르티 세포의 생존력 및 아포토시스를 계산하였다.
- [0087] 1-5. 세포 형태
- [0088] 압축된 세포와 탈-압축된 세포의 형태를 비교 및 분석하기 위하여, 상기 세포를 상기 1-1의 압축 단계 및 탈-압축 단계에서 얻은 세포를 13,500 g에서 20초간 원심분리하여 이를 0.25% 글루타르알데하이드(glutaraldehyde)를 통해 고착(fixation)시켰다. 이 후, 현미경을 통해 세포 멤브레인 분포 및 비편모조류화(deflagellation) 여부를 관찰하였고, Cellometer Auto T4 Cell Counter (Nexcelom Bioscience) ($n > 50$)을 통해 세포 크기를 측정하였다.
- [0090] 1-6. 자극 장치에서 수득한 클라미도모나스 라인하르티의 세포질 유리(free) Ca^{2+} 유입의 확인
- [0091] 본원 발명의 자극 장치의 회수 탱크에서 수득한 클라미도모나스 라인하르티(1×10^5 cell/ml)를 13,500 g로 20초간 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 남은 펠렛을 1 mM 설파피라존(sulfinpyrazone)이 포함된 NMG+/K⁺ 완충액(1 mM 설파피라존을 포함하고, pH 5.6까지 N-methyl-D-glucamine (NMG)을 추가하고, 5 mM HEPES, 10 mM HCl, 1 mM KCl, 200 μM K⁺ BAPTA를 포함함)과 DMSO (Sigma-Aldrich)에 용해된 3 μM Fura-2에 용해하였다. 해당 각 시료를 36도, 2시간 조건으로 배양한 뒤 TAP배지를 이용하여 3회 세척하였다. 이 후, dye-free NMG+/K⁺ 완충액(pH 6.8)을 첨가하여 4도에서 10분간 암 조건으로 배양하였다. 공초점 현미경을 이용하여 세포의 Fura-2- Ca^{2+} 를 촬영하였다.
- [0093] 1-7. 설폰-포스포-바닐린 방법(비색법)(Sulpho-phospho-vanillin method (colorimetric method))
- [0094] 본원 발명의 자극 장치의 회수 탱크에서 수득한 클라미도모나스 라인하르티(1×10^5 cell/ml)를 13,500 g로 20초간 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 세포의 펠렛에 95% 에탄올(Samshun pure chemical)을 넣어 밤새 처리한 후, 13,500 g로 10분간 원심분리하였다. 이 후, 펠렛을 제거하고 상등액 (100% ethanol+lipid)을 96-well plate에 옮긴 후, 드라이 오븐에서 90도로 증발시키고 각 웰에 100 μl 의 황산(sulfuric acid)을 첨가하여 90도에서 20분간 반응시켰다. 이 후, 50 μl 바닐린-인산염(vanillin-phosphate)(0.25 mg/ml vanillin in 17% phosphoric acid)를 각 웰에 첨가하여 실온에 10분간 반응시킨 후, ELISA를 통해 540 nm에서 OD값을 측정하였다.
- [0096] 1-8. GC-MS 분석
- [0097] 본원 발명의 자극 장치의 회수 탱크에서 수득한 클라미도모나스 라인하르티(1×10^5 cell/ml)를 13,500 g로 20초간 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 세포의 펠렛에 1.0 ml의 톨루엔 및 10% (v/v) 메탄올 내 염화아세틸을 첨가하여 재-현탁하였다. 그 후, 샘플을 120분, 70도에서 배양하고, 차갑게 식힌 후, 0.2 ml의 증류수를 첨가하여 반응을 정지시켰다. FAMES를 1.25 ml의 hexane - methyl tert-butyl ether (1:1)을 추가하여 추출하고, 10분간 부드럽게 흔들어준 후, 2500 $\times$ g, 6분간 원심분리하고 유기층(상부층)을 다른 새로운 튜브로 옮겼다. 시료를 클린업하기 위하여, 3 ml의 클리닝 시약(10.8 g NaOH in 900 ml dH_2O)을 넣고 5분간 흔들어 준 뒤, 유기층(상부층)을 다른 새로운 튜브로 옮긴 후 40도에서 증발시켰다. FAMES의 재현탁은 헥산을 이용하였으며, 상기 FAMES 시료를 J&W GC column DB-5ms (30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μm)를 포함하고, 검출기로서 LECO Pegasus III Time-of-Flight Mass Spectrometer(TOMS) (Agilent Tech)가 설치된 Agilent 6890N 가스 크로마토그래피에 주입

하였다. 280도의 유입 온도에서 10:1 분열(split) 조건으로 1 μ L의 주입 부피를 수행하였으며, 캐리어 가스는 헬륨을 이용하였고, 고정된 유량은 1 mL/min으로, 30도로 10분, 램프는 10도/분에서 300도까지 조건을 두었고, 10분간 유지하는 조건으로 수행하였다. FAMES 시료의 GC 분석은 KIST(Korea Institute of Science and Technology)의 ACC(Advanced Analysis Center)에 의뢰하여 분석하였다.

[0099] 1-9. 나일 레드 염색(Nile red staining)을 통한 클라미도모나스 라인하르티 지질의 정성 분석

[0100] 본원 발명의 자극 장치를 이용하여 기계적 자극을 받은 클라미도모나스 라인하르티의 지질 생산량 변화를 정성적으로 확인하기 위해서 Nile red staining (Sigma Aldrich)를 수행하였다. 본원 발명의 자극 장치의 회수 탱크에서 수득한 클라미도모나스 라인하르티의 배양액을 2.5% 글루타르알데히드(glutaraldehyde)를 밤새 처리하여 세포를 고정하였다. 이후 배양액과 Nile Red dye를 3:1 비율로 혼합하여 10분간 40도로 암조건에서 배양하였다. 상기 시료의 이미지는 공초점 현미경을 여기 파장(excitation wavelength)은 543nm, 분출 파장(emission wavelength) 630nm으로 하여 확인하였다.

[0102] 1-10. qRT-PCR(Quantitative real-time PCR 수행

[0103] mRNA 발현 정도를 확인하여 lipid를 정량적으로 분석하기 위하여 Real time qPCR을 수행하였다. 본원 발명의 자극 장치의 회수 탱크에서 수득한 클라미도모나스 라인하르티 배양액에 그람 아이오딘(gram iodine)(10 : 1 v/v)로 고정하여 혈구계산판(hemocytometer)(Superior)을 이용하여 세포 수를 계산하였다. 각 시료의 세포 수 조건을 동일하게 맞추기 위해 세포 수 계산 결과를 바탕으로 희석하여 각 시료의 세포 수를 $5-6 \times 10^6$ cell/ml(기준값)로 맞추었다. 각 시료를 PBS로 세척한 후, 10,000rpm에서 15초간 원심분리하였다. 이 후, 상등액을 제거한 펠렛을 RNAeasy Plant Mini Kit(Qiagen)를 이용하여 gDNA 제거 후, total RNA를 추출하였다. 상기 각 시료의 RNA 누락을 방지하기 위해 Reverse Transcription Kit(Qiagen)를 이용하여 cDNA로 합성 후 QuantiFast SYBR Green PCR Kit (Qiagen)와 PCR장치인 Rotor-Gene Q (Qiagen)를 이용하여 유전자를 증폭하였다. PCR에는 하기 표 1의 총 6가지의 primer(CBLP, Actin, ACCase, DGAT, LPAAT 및 Mat3)가 사용되었으며, 각 primer에 대한 threshold 0.1 기준의 사이클 시간을 Rotor-Gene Q Series Software(Qiagen)를 이용하여 delta-delta Ct value로 데이터화하였다. 최종적으로 delta-delta Ct를 CBLP (housekeeping gene)의 발현 정도에 대한 각 프라이머별 mRNA의 상대 농도로 일반화하여 확인하였다.

표 1

[0104]

Gene	Forward primer sequence (5'-3')	Reverse primer sequence (5'-3')
CBLP	CTACGTCAACACCGTGACCG	CATGGCAATGCCGTCCTT
Mat3	CGCGAGATATCCGGTCAT	CCAAGTGCAGAGCAATCATC
E2F1	GCAGCCACACAGGAGGTT	CGGCTTGTTGAGGTCAAGG
ACCase	CACAGACGGGTAGTTGTGGA	GAGCTACCTAAGCGCTCCTG
DGAT	CCCGGAGGGCACGTGTAT	CCCGGACAGCTAGGTTCCA
LPAAT	CGTGATGATAAACCGTGTGG	TCACCCTCAGGAAGAACAG

[0106] 실시예 1. 폴리우레탄 비드(Polyurethane bead) 제작 및 이의 형태 및 지름 확인

[0107] 상기 실험예 1-2의 방법에 따라, 폴리우레탄이 20% (w/v), 25% (w/v), 30% (w/v), 35% (w/v) 및 40% (w/v)로 함유된 폴리우레탄 비드를 제형하였고, 이의 형태, 지름, 표면 및 단면을 확인하였다. 그 결과를 도 3, 표 1 및 표 2에 나타내었다.

[0108] 도 3의 a 및 표 1에 나타난 바와 같이, 실시예 1에서 제형된 각각의 폴리우레탄 농도 20% (w/v), 25% (w/v), 30% (w/v), 35% (w/v) 및 40% (w/v)에 대한 폴리우레탄 비드의 형태를 확인한 결과, 20% (w/v)의 비드는 낮은 밀도로 매우 불안정한 제형이 나타나 제형 후, 수압에 의한 비드 수축(bead shrink) 현상이 나타남을 확인하였다. 35% (w/v) 및 40% (w/v) 비드는 점성이 강하여 꼬리가 달린 형태로 제형되어 불안정함을 확인하였다. 25% (w/v) 및 30% (w/v) 농도의 폴리우레탄 비드의 제형은 일정한 구형으로, 안정적인 제형이 형성됨을 확인하였다.

- [0109] 또한, 도 3의 b 및 표 2에 나타난 바와 같이, 실시예 1에서 제형된 각각의 폴리우레탄 농도 20% (w/v), 25% (w/v), 30% (w/v), 35% (w/v) 및 40% (w/v)에 대한 폴리우레탄 비드의 지름을 확인한 결과, 20% (w/v) 농도의 폴리우레탄 비드는 평균 2.410 cm, 25% (w/v) 농도의 폴리우레탄 비드는 평균 2.507 cm, 30% (w/v) 농도의 폴리우레탄 비드는 평균 2.499 cm, 35% (w/v) 농도의 폴리우레탄 비드는 평균 2.483 cm 및 40% (w/v) 농도의 폴리우레탄 비드는 평균 2.353 cm임을 확인하였다.
- [0110] 또한, 도 3의 c를 확인한 결과, 30% (w/v)의 폴리우레탄 비드의 표면은 미세한 구멍이 무수히 존재하는 다공성 구조이고, 단면 내에는 특정 크기의 빈 공간이 존재하는 것을 확인하였다.
- [0111] 또한, 압축 단계 또는 탈-압축 단계에서 각 농도의 폴리우레탄 비드의 복원 정도는 폴리우레탄 농도가 낮을수록 복원되는 속도가 빨랐으며, 40%(w/v)의 폴리우레탄 비드를 제외한 모든 비드가 50분 이내로 복원되는 것을 확인하였다.
- [0113] 따라서, 본 발명의 자극 장치에 이용 시, 우수한 탄성력 및 복원력을 지니는 30%(w/v) 폴리우레탄 비드가 가장 최적임을 확인하였다.
- [0115] **실시예 2. 본 발명의 자극 장치를 이용한 자극 조건에서 폴리우레탄 비드의 강인성(Robustness) 확인**
- [0116] 본 발명의 자극 장치를 이용한 자극 조건에서 폴리우레탄 비드의 강인성(Robustness)을 확인하였다.
- [0117] 구체적으로, 반복적으로 폴리우레탄 비드를 압축 단계 및 탈-압축 과정 횟수를 1 내지 10회 수행하여 30%(w/v)의 폴리우레탄 비드가 복원되는 정도를 확인하여 물리적 특성 변화(크기 및 탄성력)를 확인하였다. 또한, 본 발명의 자극 장치를 이용한 자극 조건에서 비드가 녹색으로 변색됨을 확인함에 따라, 비드의 특성 변화 여부 및 회수 과정에 영향을 줄 수 있는 클라미도모나스 라인하르티의 비드 내부로 침투 여부를 확인하기 위하여, 클라미도모나스 라인하르티와 비드를 일주일 이상 배양하고, 비드 표면을 세척한 액체(PBS)(solution A) 및 비드가 흡수한 내부 액체(PBS)(solution B)에 대한 흡광도를 확인하였다. 그 결과를 도 4에 나타내었다.
- [0118] 도 4의 a에 나타난 바와 같이, 압축 단계 및 탈-압축 과정에도 본 발명의 폴리우레탄 비드의 크기 및 탄성력은 변하지 않고 그대로 유지됨을 확인하여, 강인성이 뛰어난 것을 확인하였다.
- [0119] 도 4의 b에 나타난 바와 같이, 방출된 클라미도모나스 라인하르티의 색소가 폴리우레탄 비드 표면에 흡착된 것으로, 비드 내부의 미세한 공극을 통과하여 세포가 비드 내부로 흡수된 것이 아님을 확인하였다. 따라서, 비드 변색 현상은 클라미도모나스 라인하르티의 지질 생산에 영향을 미치지 않는 것으로 확인하였다.
- [0121] **실시예 3. 본 발명의 자극 장치를 이용한 자극 조건에서 클라미도모나스 라인하르티의 세포 크기, 칼슘 유입-매개된 비편모조류화(deflagellation) 및 생리학적 변화 관련 유전자 발현 확인**
- [0122] 본 발명의 자극 장치를 이용한 자극 조건에서 클라미도모나스 라인하르티의 세포 크기, 칼슘 유입-매개된 비편모조류화(deflagellation) 및 형태적 변화 관련 유전자 발현 정도를 확인하였다.
- [0123] 구체적으로, 본 발명의 자극 장치를 이용하여 자극된 클라미도모나스 라인하르티와 이의 대조군 세포와 비교하여, 상기 실험예 1-5의 방법에 따라, 12시간 또는 24시간 자극된 클라미도모나스 라인하르티 세포 및 대조군 세포의 크기를 확인하였다. 실험예 1-6의 방법에 따라, 2시간 자극된 클라미도모나스 라인하르티 세포 및 대조군 세포의 세포질 유리(free) Ca^{2+} 유입을 확인하였다. 또한, 실험예 1-10의 방법에 따라 qRT-PCR(Quantitative real-time PCR) 수행하여 생리학적 변화와 관련된 Mat3 및 E2F1의 mRNAs 발현 정도를 확인하였다. 그 결과를 도 5에 나타내었다.
- [0124] 도 5의 a 및 b에 나타난 바와 같이, 본 발명의 자극 장치를 이용하여 자극된 클라미도모나스 라인하르티 세포는 멤브레인 왜곡(membrane distortion)이 유도되어 칼슘 유입이 대조군 세포보다 증가되어 비편모조류화(deflagellated)됨을 확인하였다.
- [0125] 도 5의 c에 나타난 바와 같이, 본 발명의 자극 장치를 이용하여 12시간 동안 자극된 클라미도모나스 라인하르티 세포의 크기는 최대 7.2 μm 임을 확인하였다. 24시간 동안 자극된 세포는 7.8 μm 이고, 대조군은 6.7 μm 임을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 자극 장치를 이용하여 자극된 클라미도모나스 라인하르티 세포는 대조군보다 세포

의 크기가 더 커짐을 확인하였다

- [0126] 도 5의 d에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 자극 장치를 이용하여 자극된 클라미도모나스 라인하르티 세포에서 생리적 변화와 관련된 Mat3의 mRNAs가 자극 12시간 조건에서 유의적으로 증가됨을 확인하였다. 상기 Mat3의 발현이 유의적 변화가 있다는 점에서, 압축 스트레스에 의해 클라미도모나스의 세포 사이클의 생리적 변화가 발생했음을 확인하였다.
- [0128] **실시예 4. 본 발명의 자극 장치를 이용한 자극 조건에서 클라미도모나스 라인하르티의 지질 생성 확인**
- [0129] 본 발명의 자극 장치를 이용한 자극 조건에서 클라미도모나스 라인하르티의 지질 생산을 확인하였다.
- [0130] 구체적으로, 본 발명의 자극 장치를 이용하여 자극된 클라미도모나스 라인하르티와 이의 대조군 세포와 비교하여, 실험에 1-9의 나일 레드 염색(Nile red staining) 방법을 이용하였고, 본 발명의 자극 장치를 이용하여 0, 4, 8, 12 및 24 시간 자극 조건을 주었다. 또한, 본 발명의 50 ml 자극반응 탱크에 자극기를 이용하여 0, 4 또는 8 ml 부피로 압력을 가하여 세포에 대한 각 자극 조건을 달리하였다. 상기 각 조건에 따른 클라미도모나스 라인하르티 세포 또는 대조군의 지질 소립(lipid droplet) 생성을 정성 및 정량 분석을 수행하였다. 그 결과를 도 6에 나타내었다.
- [0131] 도 6의 a 및 b에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 자극 장치를 이용하여 자극된 클라미도모나스 라인하르티 세포 내부에 자극 시간이 지남에 따라, 또는 압력 정도에 따라 지질 소립이 증가됨을 확인하였다.
- [0133] **실시예 5. 본 발명의 자극 장치를 이용한 자극 조건에서 클라미도모나스 라인하르티의 지질 생산 효율 확인**
- [0134] 본 발명의 자극 장치를 이용한 자극 조건에서 클라미도모나스 라인하르티의 지질 생산 효율을 확인하였다.
- [0135] 구체적으로, 압축 단계 또는 탈-압축단계 4, 8, 12 및 24 시간 동안 자극된 클라미도모나스 라인하르티 세포 또는 대조군의 지질 생산 효율을 상기 실험에 1-7의 설폰-포스포-바닐린 방법(비색법)에 따라 확인하였다. 그 결과를 도 7에 나타내었다.
- [0136] 도 7의 a에 나타낸 바와 같이, 단세포의 지질 소립 합성 정도를 확인한 결과, 4시간 자극을 준 클라미도모나스 라인하르티 세포가 대조군과 비교하여 높은 단위세포 내 지질량이 측정됨을 확인하였다. 또한 4시간 간격으로 자극 시간이 증가함에 따라, 단위세포 내 지질의 대조군 세포 대비 증가율을 분석한 결과, 각각 65%(4시간), 78%(8시간), 47%(12시간)의 증가율이 확인되었다.
- [0137] 도 7의 b에 나타낸 바와 같이, 총 세포의 지질 소립 합성 정도를 확인한 결과, 대조군과 비교하여 총 세포의 지질 소립 합성이 증가되었음을 확인하였다.
- [0138] 따라서, 본 발명의 자극 장치를 이용하여 자극된 클라미도모나스 라인하르티는 대조군보다 지질 생산 효율이 우수함을 확인하였다.
- [0140] **실시예 6. 본 발명의 자극 장치를 이용한 자극 조건에서 클라미도모나스 라인하르티의 지질 함량 변화**
- [0141] 본 발명의 자극 장치를 이용한 자극 조건에서 클라미도모나스 라인하르티의 지질 함량의 변화를 확인하였다.
- [0142] 구체적으로, 본 발명의 자극 장치를 이용하여 4, 8 및 12시간 자극 조건을 주었다. 또한, 본 발명의 50 ml 자극반응 탱크에 자극기를 이용하여 0 또는 4ml 부피로 압력을 가하여 세포에 대한 각 자극 조건을 달리하였다. 상기 각 조건에 따라 자극된 클라미도모나스 라인하르티 세포의 지질 함량 변화를 실험에 1-8의 방법에 따라 분석하였다. 그 결과를 도 8 및 표 2에 나타내었다.

표 2

Fatty acid	Control	4h-0ml	4h-4ml	8h-0ml	8h-4ml	12h-0ml	12h-4ml
C14:0	5.78	5.46	8.26	4.77	4.41	5.30	4.49
C16:0	27.38	26.6	22.3	23.28	25.26	24.59	32.68
C18:0	23.73	17.5	21.46	17.42	16.57	20.07	19.54
C18:2	0.00	1.37	1.22	0.83	0.91	1.27	1.09
C18:3	0.00	1.98	1.43	1.11	1.12	1.42	1.64
C20:0	10.94	15.52	9.77	12.44	14.74	9.61	8.04
ΣPUFAs	0.00	3.35	2.64	1.94	2.02	2.69	2.73
ΣOthers	32.17	31.58	35.57	40.14	37.0	37.74	32.53

[0143]

[0144]

도 8에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 자극 장치에 따라 자극된 클라미도모나스 라인하르티 세포는 C14, C16, C18, C20, C21, C24, C27, C28 및 C29의 사슬 길이를 갖는 지방산을 함유함을 확인하였다. 또한, 대조군에 비해 압축 스트레스를 받은 모든 클라미도모나스 라인하르티 세포에서 다불포화지방산(Polyunsaturated fatty acid, PUFA)가 발생하는 것을 확인할 수 있었다. 따라서, 압축 스트레스에 의해 클라미도모나스 라인하르티 세포 내에 지질 구성이 변화하는 것을 알 수 있었다.

[0146]

실시예 7. 본 발명의 자극 장치를 이용한 자극 조건에서 클라미도모나스 라인하르티의 지질 관련 mRNA 확인

[0147]

본 발명의 자극 장치를 이용한 자극 조건에서 클라미도모나스 라인하르티의 지질 관련 mRNA 발현 정도를 확인하였다.

[0148]

구체적으로, 4, 8, 12 및 24 시간 자극 조건에 따라 자극된 클라미도모나스 라인하르티 세포의 지질 관련 mRNA 발현 정도를 실험에 1-10의 방법에 따라 분석하였다. 그 결과를 도 9에 나타내었다.

[0149]

도 9에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 자극 장치에 따라 자극된 클라미도모나스 라인하르티 세포가 대조군 세포와 비교하여 ACCase, DGAT 및 LPAAT의 mRNA 발현이 상향-조절됨을 확인하여, 본 발명의 자극 장치에 따라 자극된 클라미도모나스 라인하르티 세포는 지질을 효과적으로 생산함을 확인하였다.

[0151]

실시예 8. 본 발명의 자극 장치를 이용한 자극 조건에서 클라미도모나스 라인하르티 세포의 아포토시스 확인

[0152]

본 발명의 자극 장치를 이용한 자극 조건 또는 직접적 자극을 가한 조건에서 클라미도모나스 라인하르티 세포의 아포토시스 값을 확인하였다.

[0153]

구체적으로, 본 발명의 자극 장치를 이용하여 4, 8, 12 및 24 시간 자극 조건을 주었다. 또한, 본 발명의 50 ml 자극반응 탱크에 자극기를 이용하여 0 또는 4 ml 부피로 압력을 가하여 세포에 대한 각 자극 조건을 달리하였다. 또한, 도 10에 나타낸 바와 같이, 페트리 디쉬에 PDMS(polydimethylsiloxane)을 채워서 굳힌 후, 상기 굳혀진 PDMS와 페트리 디쉬의 평평한 면을 이용하여 세포에 직접적으로 자극을 가한 조건을 주었다.

[0154]

상기 각 조건에 대한 클라미도모나스 라인하르티 세포의 아포토시스 값을 실험에 1-4의 방법에 따라 확인하였다. 그 결과를 도 11에 나타내었다.

[0155]

도 11에 나타낸 바와 같이, 직접적으로 세포에 자극을 가한 조건에서는 40% 이상의 아포토시스 값(%)이 나타남을 확인하였다. 또한 24시간 자극 조건을 제외하고, 4ml 부피의 압력을 가한 조건과 4, 8 및 12 시간 자극 조건에서 아포토시스가 저해됨을 확인하였다.

[0157]

상기 일련의 실험을 통하여, 본 발명의 자극 장치를 이용 시, 압축 단계, 탈-압축 단계 및 회수 단계를 거쳐 클

라미도모나스 라인하르티 세포에 기계적 자극을 효과적으로 가하게 됨을 확인하였다. 또한, 상기 자극 장치 내 30%(w/v) 폴리우레탄 비드를 이용 시, 상기 비드는 우수한 탄성력, 복원력 및 강인성이 존재하여 효과적으로 세포에 자극을 가하고, 자극 시간은 0 내지 24시간 자극이 최적임을 확인하였다.

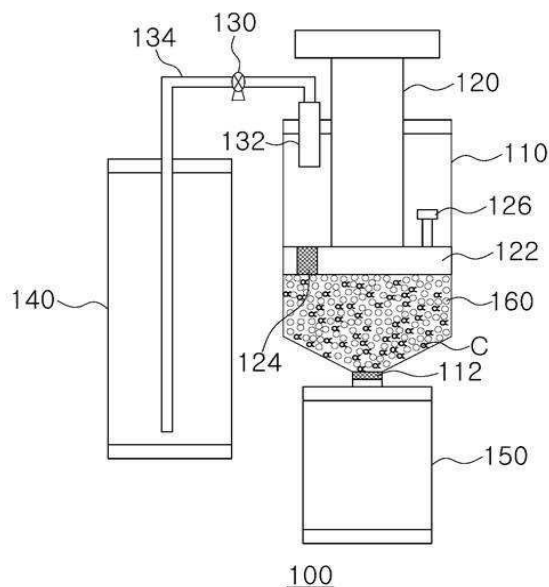
[0158] 또한, 본 발명의 자극 장치를 이용하여 자극된 클라미도모나스 라인하르티 세포는 멤브레인 왜곡(membrane distortion)이 유도되어 칼슘 유입이 대조군 세포보다 증가되어 비편모조류화(deflagellation) 됨을 확인하였다. 또한, 생리적 변화와 관련된 Mat3 mRNAs 발현이 증가되어, 생리적 변화가 발생됨을 확인하였고, 자극 되지 않은 대조군과 비교하여 세포의 크기가 더 커짐을 확인하였다. 또한, 지질 관련된 ACCase, DGAT 및 LPAAT의 mRNA 발현이 증가되고, 자극된 클라미도모나스 라인하르티는 C14, C16, C18, C20, C21, C24, C27, C28 및 C29의 사슬 길이를 갖는 지방산을 함유하고, 대조군과 비교하여 다가불포화지방산(Polyunsaturated fatty acid, PUFA)이 발생하는 것을 확인하였고, 이에 따라, 압축 스트레스에 의해 클라미도모나스 라인하르티 세포 내에 지질 구성이 변화하는 것을 확인하였다.

부호의 설명

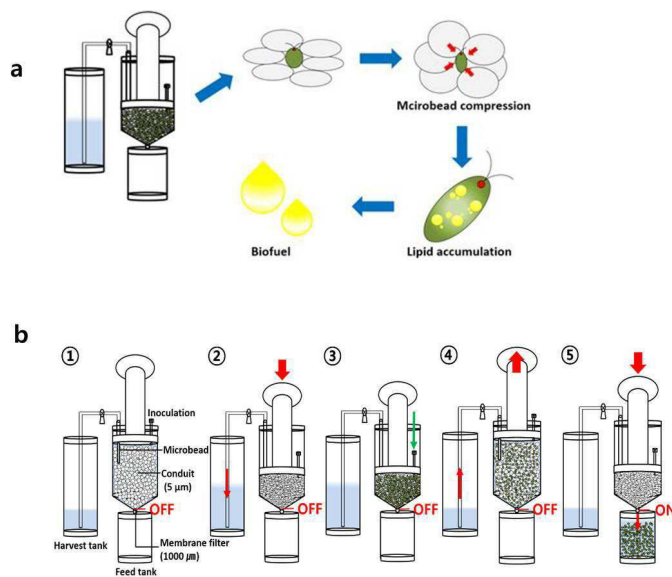
[0159] 100: 미세조류 세포 자극 장치
110: 자극반응 탱크 112: 제1필터
120: 자극기 122: 자극기 헤드
124: 제2필터 126: 주입구
130: 펌프 132: 노즐
134: 관 140: 공급 탱크
150: 회수 탱크 160: 폴리우레탄 비드
C: 미세조류 세포

도면

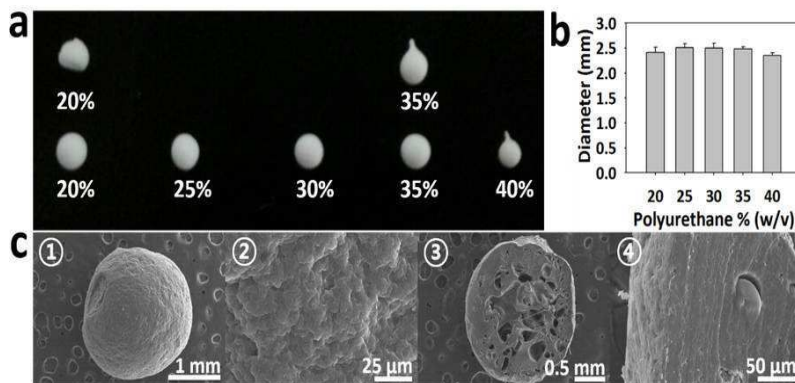
도면1



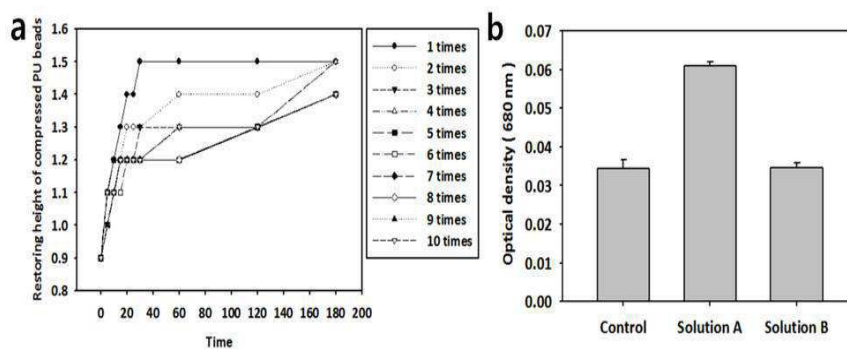
도면2



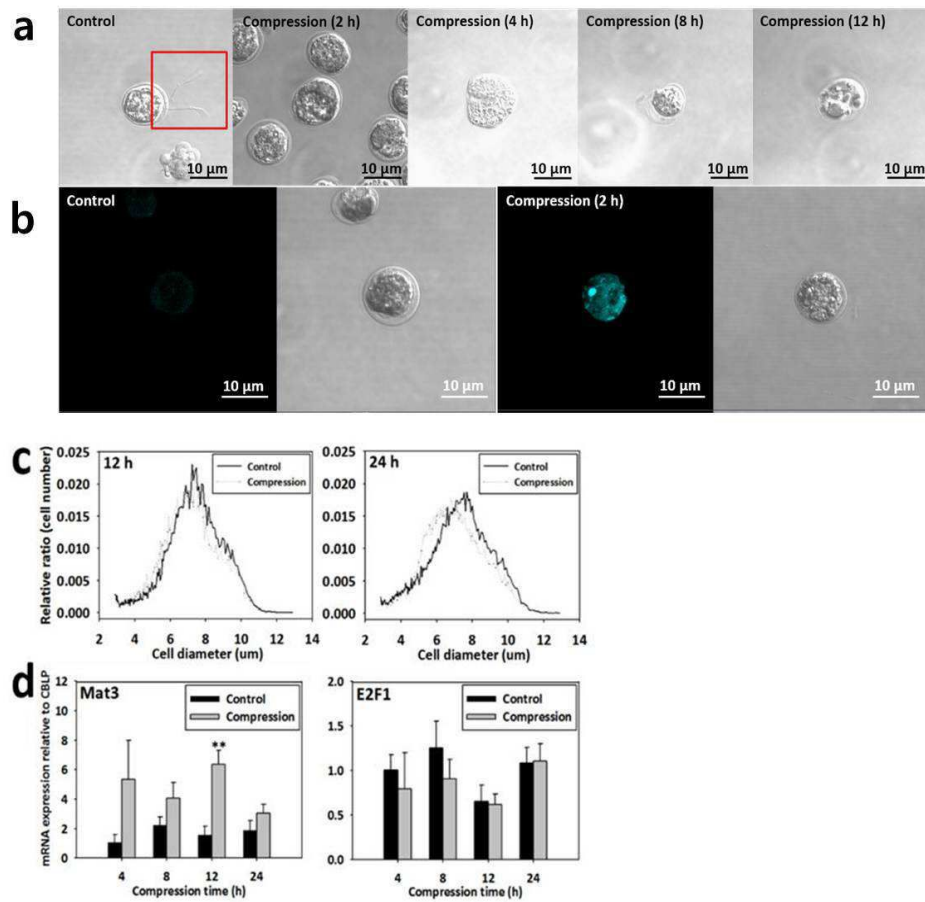
도면3



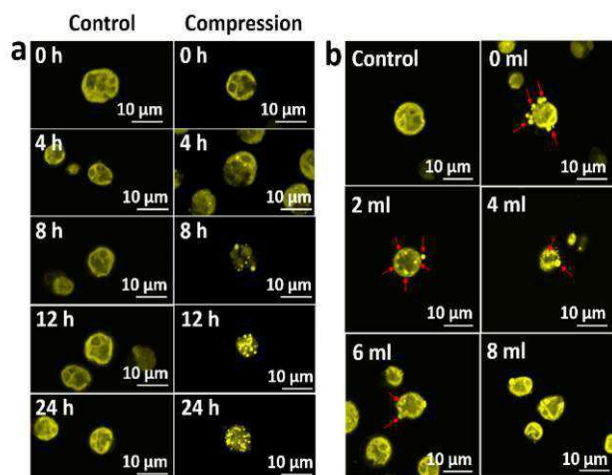
도면4



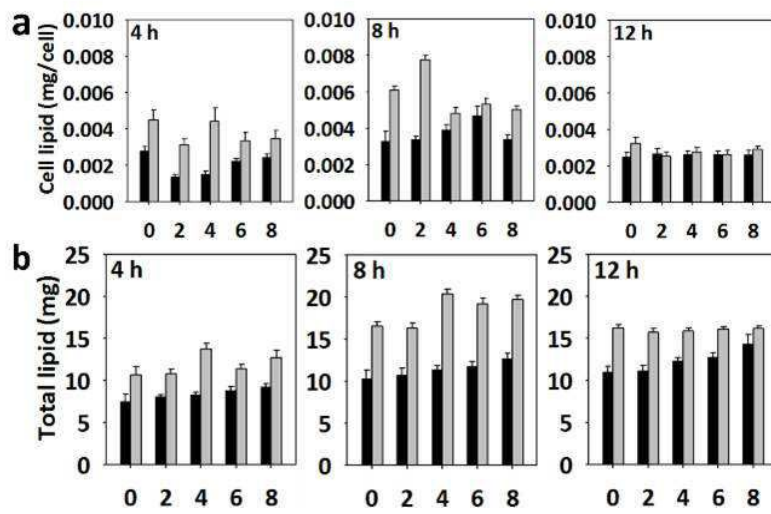
도면5



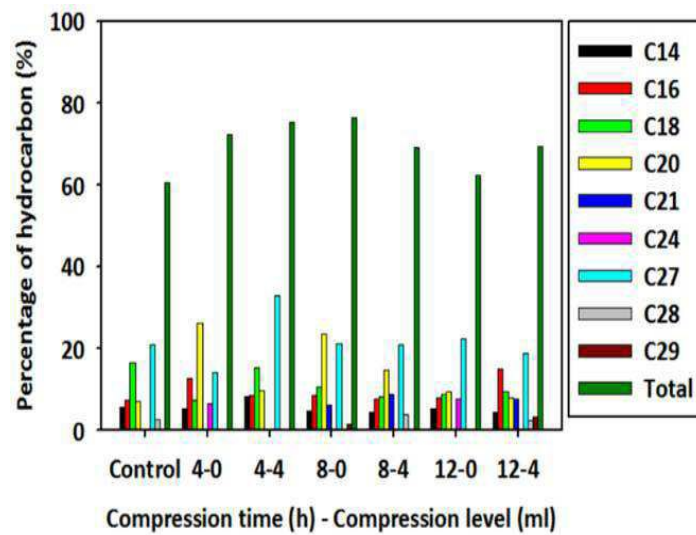
도면6



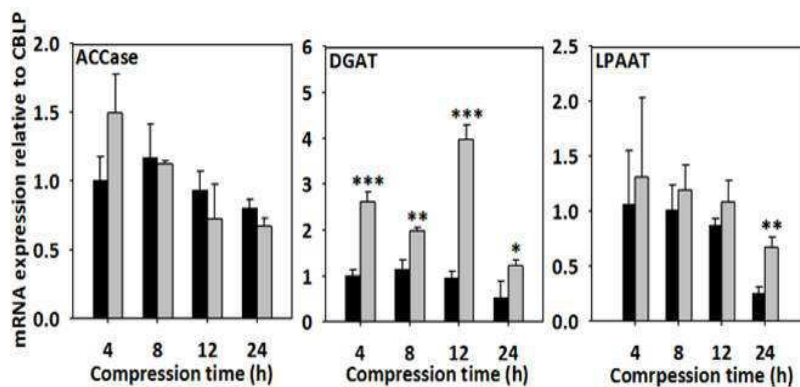
도면7



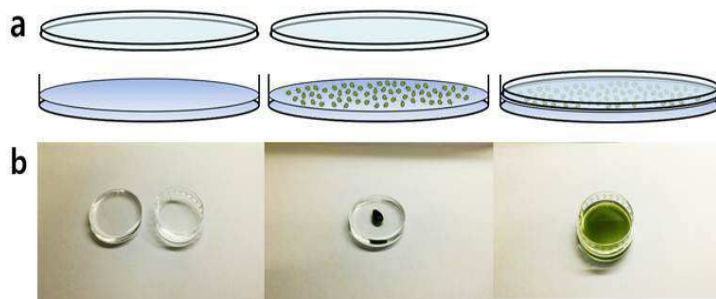
도면8



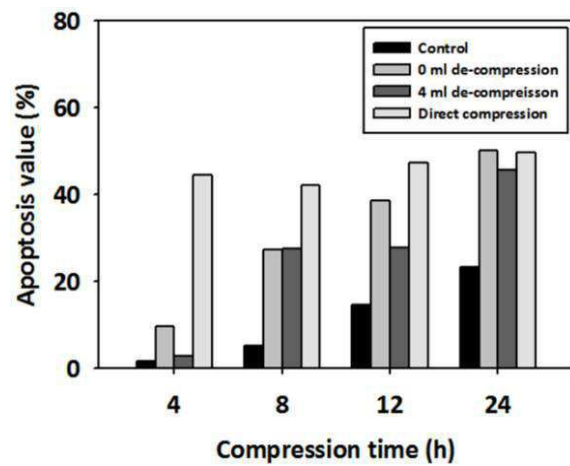
도면9



도면10



도면11



서열 목록

- <110> INHA-INDUSTRY PARTNERSHIP INSTITUTE
- <120> Microalgae cell stress apparatus and method for increasing
production of microalgae lipid using the same
- <130> 1-163-1
- <150> KR 10-2015-0124957
- <151> 2015-09-03
- <160> 12
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Forward primer of CBLP Gene
- <400> 1
- ctacgtcaac accgtgaccg
- <210> 2

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer of CBLP Gene

<400> 2

catggcaatg ccgtcctt 18

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer of Mat3 Gene

<400> 3

cgcgagatat ccggtcat 18

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer of Mat3 Gene

<400>

4

ccaagtgcag agcaaatcat c 21

<210> 5

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer of E2F1 Gene

<400> 5

gcagccacac aggaggtt 18

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer of E2F1 Gene

<400> 6

cggcttggtt gaggtcaagg	20
<210> 7	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Forward primer of ACCase Gene	
<400> 7	
cacagacggg tagttgtgga	20
<210> 8	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Reverse primer of ACCase Gene	
<400> 8	
gagctaccta agcgctcctg	20
<210> 9	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Forward primer of DGAT Gene	
<400> 9	
cccggagggc acgtgtat	18
<210> 10	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Reverse primer of DGAT Gene	
<400> 10	
ccgcgacagc taggttcca	19
<210> 11	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Forward primer of LPAAT Gene

<400> 11

cgtgatgata aaccgtgtgg

20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer of LPAAT Gene

<400> 12

tcaccctcag ggaagaacag

20