



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0039582
(43) 공개일자 2023년03월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/24 (2017.01) C12M 1/00 (2006.01)
C12M 1/26 (2006.01) C12M 3/06 (2006.01)
C12N 1/12 (2006.01) C12N 11/02 (2020.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/24 (2013.01)
C12M 23/16 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0115330
(22) 출원일자 2022년09월14일
심사청구일자 2022년09월14일
(30) 우선권주장
1020210122716 2021년09월14일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암
동5가)
(72) 발명자
심상준
서울특별시 영등포구 의사당대로 127, 102동 140
1호
성영준
서울특별시 영등포구 여의동로3길 10, 201동 501
호
이정섭
서울특별시 노원구 동일로 1456, 709동 504호
(74) 대리인
정은열, 김태훈

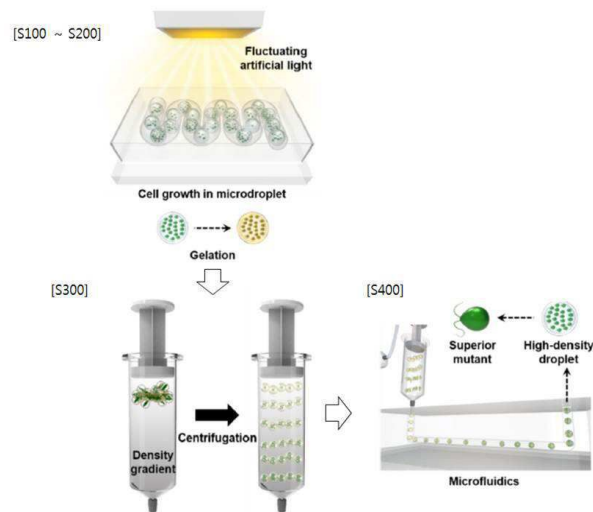
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 겔 미세액적 기반 미세조류 선별방법

(57) 요약

본 발명은 겔 미세액적 기반 미세조류 선별방법에 관한 것으로, 무작위로 생성된 돌연변이 라이브러리에서, 향상된 광독립 영양성장을 하는 광합성 미세조류 균주를 고속으로 선별할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12M 33/04 (2013.01)

C12M 47/04 (2013.01)

C12N 1/12 (2019.02)

C12N 11/02 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711128194
과제번호	2020M3H7A1098295
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	유용물질 생산을 위한 CarbontoX 기술개발(R&D)
연구과제명	연소가스 내 CO ₂ 직접 광생물 전환을 위한 고효율 공정 원천 기술
기 여 율	1/1
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2021.01.27 ~ 2022.01.26

명세서

청구범위

청구항 1

- (a) 유상(oil phase)의 연속상 유체, 및 미세조류 균주를 포함하는 수상(water phase)의 분산상 유체를 미세유체 장치에 주입하여, 내부에서 상기 미세조류 균주가 배양되는 미세액적을 생성하는 단계;
- (b) 상기 미세유체 장치 내에서 상기 미세액적을 겔화하여 겔 미세액적을 생성하고, 회수하는 단계;
- (c) 회수된 상기 겔 미세액적을, 밀도 구배를 가지는 수상(water phase)의 컬럼 용액에 로딩하고, 원심분리하여, 밀도에 따라 상기 겔 미세액적을 상기 컬럼 용액 내에 분산시키는 단계; 및
- (d) 상기 컬럼 용액 내에 분산된 상기 겔 미세액적을, 미세액적 수송채널에 주입하여 질량에 따라 상기 겔 미세액적을 선별하는 단계;를 포함하는 겔 미세액적 기반 미세조류 선별방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 분산상 유체는, 소정의 겔화온도 이하에서 겔상(gel phase)을 형성하는 하이드로겔 성분을 포함하고,

상기 (a) 단계에서, 상기 미세유체 장치의 온도를 상기 겔화온도보다 고온으로 제어하며,

상기 (b) 단계에서, 상기 미세유체 장치의 온도를 상기 겔화온도 이하로 제어하여, 상기 미세액적을 겔화하는 겔 미세액적 기반 미세조류 선별방법.

청구항 3

청구항 2에 있어서,

상기 하이드로겔 성분은,

젤라틴, 알긴산, 아가로오스, 히알루론산, 폴리에틸렌글리콜, 콜라겐, 피브린, 키토산, 피브린, 피브리노젠, 피브로넥틴, 라미닌, 및 엘라스틴으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상을 포함하는 겔 미세액적 기반 미세조류 선별방법.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 (b) 단계에서, 유상(oil phase)의 수송유체를 상기 미세유체 장치에 주입하여, 상기 겔 미세액적을 배출 및 회수하는 겔 미세액적 기반 미세조류 선별방법.

청구항 5

청구항 1에 있어서,

상기 (b) 단계에서 회수된 상기 겔 미세액적의 외면은, 유상(oil phase)의 피막에 의해 둘러싸이고,

상기 (b) 단계와 상기 (c) 단계 사이에, 유화 분리제(emulsion breaker)를, 회수된 상기 겔 미세액적에 첨가하여, 상기 피막을 분해하는 겔 미세액적 기반 미세조류 선별방법.

청구항 6

청구항 1에 있어서,

상기 (c) 단계에서, 상기 컬럼 용액은, 하부에 밸브가 장착된 시린지의 내부에 수용되고,

상기 (d) 단계에서, 상기 밸브를 개방하여, 상기 컬럼 용액의 하층에 분산된 상기 겔 미세액적부터 순차적으로 상기 미세액적 수송채널에 주입하는 겔 미세액적 기반 미세조류 선별방법.

청구항 7

청구항 1에 있어서,

상기 미세액적 수송채널의 내경은, 상기 겔 미세액적의 직경의 2배 미만으로 형성되는 겔 미세액적 기반 미세조류 선별방법.

청구항 8

청구항 1에 있어서,

상기 겔 미세액적의 평균 직경은, 75 ~ 85 μm 인 겔 미세액적 기반 미세조류 선별방법.

청구항 9

청구항 1에 있어서,

상기 분산상 유체는 380 ~ 430 mbar의 유체압력으로 주입되고,

상기 연속상 유체는 300 ~ 350 mbar의 유체압력으로 주입되는 겔 미세액적 기반 미세조류 선별방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 겔 미세액적 기반 미세조류 선별방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 세포 성장이 우수한 미세조류의 초고속 선별을 위한 세포 함유 겔 미세액적의 질량 기반 분리 기술에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 최근 대기 중 이산화탄소의 농도 증가가 지구 생태계를 위협함에 따라, 온실가스 배출과 화석 연료 고갈을 줄이기 위한 방안으로서 다양한 탄소 포집, 활용 및 저장(CCUS) 기술이 개발되고 있다. 그 중 광합성 미생물인 미세조류를 활용해 이산화탄소를 고부가 물질로 전환하는 생물학적 전환공정이 지속 가능한 방법으로 주목받고 있다.

[0004] 미세조류는 바다나 민물에 서식하고 육안으로 확인할 수 없는 크기의 단세포 광합성 생물로서 식물성 플랑크톤이라 불리며, 지구 전역에 다양한 종이 광범위하게 분포하고, 주요 광합성 생산성의 약 50% 이상을 차지하고 있다. 이러한 미세조류는 바이오 연료, 건강기능식품, 식품보조제, 바이오플라스틱의 원료로서 그 활용가치가 높다. 미세조류의 이산화탄소 고정 효율과 바이오매스 생산성은 종래 바이오매스 공급원으로 널리 사용되는 육상 식물에 비해 상대적으로 높다. 따라서, 생물학적 탄소 처리를 위한 미세조류 바이오매스의 상업적 생산에 대한 관심이 증대되고 있다. 미세조류를 산업적 규모로 생산하기 위해서는 미세조류 배양 시스템을 스케일 업(scale up)해야 한다.

- [0005] 유전 공학을 통해 미세조류 균주를 개선하고자 하는 시도가 있었으나, 복잡한 광 환경(light environment)이 세포의 광생리학에 어떠한 영향을 미치는지에 대한 정보가 충분하지 않았기 때문에 미세조류 산업 확대에 기여하지 못했다. 이러한 한계를 보완하기 위해서, 무작위 돌연변이 유발에 의해 생성된 돌연변이 라이브러리에서 원하는 형질의 균주를 선별할 수 있는 표현형 선택 접근법(phenotypic selection approaches)이 제안되었다. FACS(fluorescence-activated cell sorting) 시스템은 생화학적 표현형 확인 및 웰 플레이트 분석(well plate assay)을 포함한 기존 세포 스크리닝 방법의 낮은 처리량을 극복할 수 있는 방안으로서 균주 선별에 널리 사용되고 있다. 그러나 여전히 높은 자본 및 운영 비용과 낮은 생존률 등의 한계가 존재한다. 이러한 단점을 극복하기 위해서, 하기 선행기술문헌의 특허문헌에 개시된 바와 같이, 미세유체 기술이 도입되고 있다. 미세액적 기반 스크리닝 시스템은 적은 양의 샘플로도 매우 빠르고 정확하게 유전적 다양성을 탐색할 수 있다. 다만, 액적 형태를 능숙하게 처리하기 위해서는 숙련된 기술과 복잡한 장비가 필요하므로 산업적 적용이 쉽지 않다.
- [0006] 이에 종래 미세조류 균주 선별 기술의 문제를 해결하기 위한 방안이 절실히 요구되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0008] (특허문헌 0001) KR 10-2009557 B1

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명은 상술한 종래기술의 문제점을 해결하기 위한 것으로, 본 발명의 일 측면은 무작위로 생성된 돌연변이 라이브러리에서, 향상된 광독립 영양성장을 하는 광합성 미세조류 균주를 고속으로 선별할 수 있는 미세조류 선별방법을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

- [0011] 본 발명에 따른 겔 미세액적 기반 미세조류 선별방법은 (a) 유상(oil phase)의 연속상 유체, 및 미세조류 균주를 포함하는 수상(water phase)의 분산상 유체를 미세유체 장치에 주입하여, 내부에서 상기 미세조류 균주가 배양되는 미세액적을 생성하는 단계; (b) 상기 미세유체 장치 내에서 상기 미세액적을 겔화하여 겔 미세액적을 생성하고, 회수하는 단계; (c) 회수된 상기 겔 미세액적을, 밀도 구배를 가지는 수상(water phase)의 컬럼 용액에 로딩하고, 원심분리하여, 밀도에 따라 상기 겔 미세액적을 상기 컬럼 용액 내에 분산시키는 단계; 및 (d) 상기 컬럼 용액 내에 분산된 상기 겔 미세액적을, 미세액적 수송채널에 주입하여 질량에 따라 상기 겔 미세액적을 선별하는 단계;를 포함한다.
- [0012] 또한, 본 발명에 따른 겔 미세액적 기반 미세조류 선별방법에 있어서, 상기 분산상 유체는, 소정의 겔화온도 이하에서 겔상(gel phase)을 형성하는 하이드로겔 성분을 포함하고, 상기 (a) 단계에서, 상기 미세유체 장치의 온도를 상기 겔화온도보다 고온으로 제어하며, 상기 (b) 단계에서, 상기 미세유체 장치의 온도를 상기 겔화온도 이하로 제어하여, 상기 미세액적을 겔화할 수 있다.
- [0013] 또한, 본 발명에 따른 겔 미세액적 기반 미세조류 선별방법에 있어서, 상기 하이드로겔 성분은, 젤라틴, 알긴산, 아가로오스, 히알루론산, 폴리에틸렌글리콜, 콜라겐, 피브린, 키토산, 피브린, 피브리노젠, 피브로넥틴, 라미닌, 및 엘라스틴으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [0014] 또한, 본 발명에 따른 겔 미세액적 기반 미세조류 선별방법에 있어서, 상기 (b) 단계에서, 유상(oil phase)의 수송유체를 상기 미세유체 장치에 주입하여, 상기 겔 미세액적을 배출 및 회수할 수 있다.
- [0015] 또한, 본 발명에 따른 겔 미세액적 기반 미세조류 선별방법에 있어서, 상기 (b) 단계에서 회수된 상기 겔 미세액적의 외면은, 유상(oil phase)의 피막에 의해 둘러싸이고, 상기 (b) 단계와 상기 (c) 단계 사이에, 유화 분리제(emulsion breaker)를, 회수된 상기 겔 미세액적에 첨가하여, 상기 피막을 분해할 수 있다.

[0016] 또한, 본 발명에 따른 겔 미세액적 기반 미세조류 선별방법에 있어서, 상기 (c) 단계에서, 상기 컬럼 용액은, 하부에 밸브가 장착된 시린지의 내부에 수용되고, 상기 (d) 단계에서, 상기 밸브를 개방하여, 상기 컬럼 용액의 하층에 분산된 상기 겔 미세액적부터 순차적으로 상기 미세액적 수송채널에 주입할 수 있다.

[0017] 또한, 본 발명에 따른 겔 미세액적 기반 미세조류 선별방법에 있어서, 상기 미세액적 수송채널의 내경은, 상기 겔 미세액적의 직경의 2배 미만으로 형성될 수 있다.

[0018] 또한, 본 발명에 따른 겔 미세액적 기반 미세조류 선별방법에 있어서, 상기 겔 미세액적의 평균 직경은, 75 ~ 85 μm 일 수 있다.

[0019] 또한, 본 발명에 따른 겔 미세액적 기반 미세조류 선별방법에 있어서, 상기 분산상 유체는 380 ~ 430 mbar의 유체압력으로 주입되고, 상기 연속상 유체는 300 ~ 350 mbar의 유체압력으로 주입될 수 있다.

[0021] 본 발명의 특징 및 이점들은 첨부도면에 의거한 다음의 상세한 설명으로 더욱 명백해질 것이다.

[0022] 이에 앞서 본 명세서 및 청구범위에 사용된 용어나 단어는 통상적이고 사전적인 의미로 해석되어서는 아니되며, 발명자가 그 자신의 발명을 가장 최선의 방법으로 설명하기 위해 용어의 개념을 적절하게 정의할 수 있다는 원칙에 입각하여 본 발명의 기술적 사상에 부합하는 의미와 개념으로 해석되어야만 한다.

발명의 효과

[0024] 본 발명에 따르면, 세포 성장이 우수한 미세조류 균주를 미세액적의 내부에서 배양하고, 그 미세액적을 겔화하여 원심분리함으로써, 세포 밀도가 높은 미세액적의 분리를 통해 높은 세포 성장률을 가지는 돌연변이 균주를 고속 선별할 수 있다.

[0025] 또한, 원심분리된 겔 미세액적을 미세유체 채널에 순차적으로 주입하여 선별함으로써, 선별 효율을 증대시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0027] 도 1은 본 발명에 따른 겔 미세액적 기반 미세조류 선별방법을 개략적으로 도시한 순서도이다.

도 2는 본 발명에 따른 겔 미세액적 기반 미세조류 선별방법에 사용되는 미세액적 주입 펌프 시스템의 일 실시예를 도시한 도면이다.

도 3은 실시예 3에 따라 미세액적을 겔화한 후 촬영한 미세유체 채널의 이미지이다.

도 4는 실시예 3에 따라 미세유체 채널에 오일(oil)을 주입하여 겔 미세액적을 회수한 후 촬영한 미세유체 채널의 이미지이다.

도 5는 실시예 3에 따라 온도를 제어하지 않고 생성한 겔 미세액적의 크기 분포(a) 및 온도를 제어하여 생성한 겔 미세액적의 크기 분포(b)를 각각 나타내는 도면이다.

도 6은 실시예 4에 따른 밀도 구배 컬럼 내 밀도 마커 비드(녹색: $\rho=1.02$, 주황색: $\rho=1.04$)의 분포를 나타낸다.

도 7은 실시예 4에 따른 유상(oil phase)에서 수상(aqueous phase)으로 상전이되는 겔 미세액적의 현미경 이미지이다.

도 8은 실시예 4에 따라 원심분리 20분 후 상층에서부터 깊이에 따른 밀도 구배 컬럼의 밴드 강도(band intensity), 및 겔 미세액적의 분포를 나타낸다.

도 9는 실시예 4에 따른 원심분리 전후 깊이에 따른 밀도 구배 컬럼의 밴드 강도(band intensity)를 비교한 결과이다.

도 10은 실시예 5에 따른 미세액적의 미세유체 채널 통과 시간에 대한 형광 활성을 나타내는 도면이다.

도 11은 실시예 5에 따른 미세유체 채널 주입 후 50초(1st out), 95초(2nd out) 및 110초(3rd out) 경과 시점에서 미세유체 채널에서 배출된 미세액적의 형광 강도 분포를 나타낸다.

도 12는 비교예에 따라 수동으로 미세액적을 회수하는 순서에 따른 돌연변이 균주의 OD₈₀₀ 값을 나타내는 박스 플롯(box plot)이다.

도 13은 실시예 5에 따라 미세액적 주입 펌프 시스템으로 미세액적을 미세유체 채널에 주입하여 배출된 순서에 따른 돌연변이 균주의 OD₈₀₀ 값을 나타내는 박스 플롯(box plot)이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0028] 본 발명의 목적, 특정한 장점들 및 신규한 특징들은 첨부된 도면들과 연관되어지는 이하의 상세한 설명과 바람직한 실시예들로부터 더욱 명백해질 것이다. 본 명세서에서 각 도면의 구성요소들에 참조번호를 부가함에 있어서, 동일한 구성 요소들에 한해서는 비록 다른 도면상에 표시되더라도 가능한 한 동일한 번호를 가지도록 하고 있음에 유의하여야 한다. 또한, "제1", "제2" 등의 용어는 하나의 구성요소를 다른 구성요소로부터 구별하기 위해 사용되는 것으로, 구성요소가 상기 용어들에 의해 제한되는 것은 아니다. 이하, 본 발명을 설명함에 있어서, 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있는 관련된 공지 기술에 대한 상세한 설명은 생략한다.
- [0029] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 바람직한 실시형태를 상세히 설명하기로 한다.
- [0031] 도 1은 본 발명에 따른 겔 미세액적 기반 미세조류 선별방법을 개략적으로 도시한 순서도이고, 도 2는 본 발명에 따른 겔 미세액적 기반 미세조류 선별방법에 사용되는 미세액적 주입 펌프 시스템의 일실시예를 도시한 도면이다.
- [0032] 도 1에 도시된 바와 같이, 본 발명에 따른 겔 미세액적 기반 미세조류 선별방법은, 유상(oil phase)의 연속상 유체, 및 미세조류 균주를 포함하는 수상(water phase)의 분산상 유체를 미세유체 장치에 주입하여, 내부에서 미세조류 균주가 배양되는 미세액적을 생성하는 단계(S100), 미세유체 장치 내에서 미세액적을 겔화하여 겔 미세액적을 생성하고, 회수하는 단계(S200), 회수된 겔 미세액적을, 밀도 구배를 가지는 수상(water phase)의 컬럼 용액에 로딩하고, 원심분리하여, 밀도에 따라 겔 미세액적을 컬럼 용액 내에 분산시키는 단계(S300), 및 컬럼 용액 내에 분산된 겔 미세액적을, 미세액적 수송채널에 주입하여 질량에 따라 겔 미세액적을 선별하는 단계(S400)를 포함할 수 있다.
- [0034] 본 발명은 세포 성장이 우수한 미세조류의 초고속 선별을 위한 세포 함유 겔 미세액적의 질량 기반 분리 기술에 관한 것으로, 미세액적 생성단계(S100), 미세액적 겔화단계(S200), 원심분리단계(S300), 및 미세액적 선별단계(S400)를 포함한다.
- [0035] 미세액적 생성단계(S100)는 미세유체 장치를 이용해, 내부에서 미세조류 균주가 배양되는 미세액적을 생성하는 공정이다. 여기서, 유상(oil phase)의 연속상 유체, 및 미세조류 균주를 포함하는 수상(water phase)의 분산상 유체를 미세유체 장치에 주입하여, 미세액적을 형성한다. 이렇게 형성된 미세액적의 내부에서 미세조류 균주가 배양된다. ‘연속상 유체’란 미세액적을 만들기 위해 연속적으로 공급되는 유체를 의미하며, 이러한 연속상 유체는 특별한 제한 없이 분산상 유체와 섞이지 않는 모든 액체가 이에 포함될 수 있다. ‘분산상 유체’란 미세액적을 구성하는 유체로서 분산상 유체가 일정 부피로 시간차를 두고 끊어져서 흐르면서 미세액적을 형성하기 때문에 분산상 유체로 명명하는 것이다. 또한, 상기 분산상 유체는 특별한 제한 없이 연속상과 섞이지 않는 모든 액체가 이에 포함될 수 있다. 본 발명에서, 연속상 유체는 유성의 유상(oil phase) 용액이고, 분산상 유체는 수성의 수상(water phase) 용액을 사용할 수 있다. 일례로, 분산상 유체가 380 ~ 430 mbar의 유체압력으로 미세유체 장치에 주입되고, 상기 연속상 유체는 300 ~ 350 mbar의 유체압력으로 주입되어 미세액적을 생성할 수 있다.
- [0036] 본 발명은 성장성 및 광합성 효율이 좋은 미세조류의 돌연변이 균주를 미세액적을 이용하여 선별할 수 있다. 따라서, 미세액적 내부에서 배양되는 미세조류 균주는 돌연변이 균주일 수 있다. 일례로, 클라미도모나스 레인하디티 (*Chlamydomonas reinhardtii*)의 돌연변이 미세조류 균주를 선별할 수 있다. 본 발명자들은 돌연변이 신균주를 클라미도모나스 레인하디티 (*Chlamydomonas reinhardtii*)의 돌연변이 PTS42라 명명하고, 2016년 9월 6일

자로한국생명공학연구원 생물자원센터 (KCTC)에 기탁하여 수탁번호 KCTC18499P를 부여받은 바 있다.

- [0037] 미세액적에 의해 캡슐화된 미세조류 세포는 광합성을 통해 외부 환경으로부터 이산화탄소를 고정시켜 바이오매스를 증가시킨다. 따라서, 높은 성장률을 보이는 돌연변이 균주를 포함하는 미세액적은 상대적으로 밀도가 높다. 본 발명은 미세액적을 고속 선별하기 위해서, 미세액적을 겔화하고, 밀도 구배 원심분리한 후, 미세유체 채널을 통과시킨다.
- [0038] 미세액적을 겔화시키기 위해서, 분산상 유체는 소정의 겔화온도 이하에서 겔상(gel phase)을 형성하는 하이드로겔 성분을 포함할 수 있다. 여기서, 하이드로겔 성분은, 젤라틴, 알긴산, 아가로오스, 히알루론산, 폴리에틸렌 글리콜, 콜라겐, 피브린, 키토산, 피브린, 피브리노겐, 피브로넥틴, 라미닌, 및 엘라스틴으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상을 포함할 수 있고, 바람직하게는 젤라틴을 사용할 수 있다.
- [0039] 따라서, 분산상 유체는 배지, 하이드로겔 성분, 및 세포 현탁액을 포함할 수 있다.
- [0041] 미세액적 겔화단계(S200)는 미세유체 장치 내에서 미세액적을 겔화하는 공정이다. 전술한 바와 같이, 분산상 유체에 하이드로겔 성분이 포함된 경우, 미세유체 장치의 온도를 겔화온도 이하로 제어하여 미세액적을 겔화함으로써, 겔 미세액적을 생성할 수 있다. 여기서, 미세액적 겔화 전에, 미세유체 장치의 온도는 겔화온도보다 고온으로 제어된다. 예를 들어, 하이드로겔 성분으로 젤라틴을 사용하는 경우, 미세액적이 겔화되지 않도록, 미세액적이 형성되는 미세유체 장치를 25 ~ 35℃로 보관하였다가, 미세유체 장치를 2 ~ 6℃로 인큐베이션하여 겔 미세액적을 생성할 수 있다. 이러한 온도 제어를 통해 균일한 크기의 겔 미세액적을 제조할 수 있다.
- [0042] 여기서, 겔 미세액적이 생성되면, 겔 미세액적을 회수하는데, 유상(oil phase)의 수송유체를 미세유체 장치에 주입하여, 생성된 겔 미세액적을 배출시켜 회수할 수 있다.
- [0043] 한편, 회수된 겔 미세액적의 외면은 유상(oil phase)의 피막에 의해 둘러싸이는 구조로 형성된다. 후술하는 밀도 구배를 가지는 수상(water phase)의 컬럼 용액 내에, 겔 미세액적을 분산시키기 위해서, 겔 미세액적의 외면을 둘러싸는 피막을 제거할 수 있다. 이를 위해, 유화 분리제(emulsion breaker, emulsion breaking solution)를, 회수된 상기 겔 미세액적에 첨가하여, 상기 피막을 분해시킬 수 있다. 이로써, 유상(oil phase)의 겔 미세액적은 수상(water phase)으로 그 상이 변하게 된다.
- [0044] 이렇게 형성된 겔 미세액적의 평균 직경은, 75 ~ 85 μm 일 수 있다.
- [0046] 원심분리단계(S300)는 겔 미세액적을 밀도 구배를 가지는 수상(water phase)의 컬럼 용액에 로딩하고, 원심분리하는 공정이다. 여기서, 세포 밀도에 따라 겔 미세액적을 분리할 수 있다. 밀도 구배 컬럼 용액은 소정의 범위 내의 밀도 값을 가지고, 시린지(syringe) 내에 형성될 수 있으며, 피펫을 이용해 겔 미세액적을 밀도 구배 컬럼의 상부에 로딩할 수 있다. 밀도 구배 컬럼 용액의 높은 액체 저항으로 인해, 로딩된 겔 미세액적은 즉시 가라앉지 않고, 밀도 구배의 상층에 분포되었다가, 원심분리 후에 밀도 구배 컬럼 내에서 그 밀도에 대응되는 특정 위치에 분포된다. 상대적으로 높은 세포 농도를 갖는 겔 미세액적이 밀도 구배 컬럼의 최하단에 위치하고, 상단으로 갈수록 세포 농도가 작은 겔 미세액적이 배열된다. 결국, 밀도 내지 질량에 따라 겔 미세액적이 밀도 구배 컬럼의 특정 위치에 분리되어 분포하게 된다.
- [0048] 미세액적 선별단계(S400)는 컬럼 용액 내에 분산된 겔 미세액적을 미세액적 수송채널에 주입하여 선별하는 공정이다. 여기서, 내부에 컬럼 용액을 수용하는 시린지의 외통 하부에 밸브가 장착되고, 그 밸브를 개방한 후, 시린지의 내통을 가압하여 겔 미세액적을 배출시켜, 미세액적 수송채널에 주입할 수 있다. 이때, 컬럼 용액의 하층에 분산된 겔 미세액적부터 순차적으로 미세액적 수송채널에 주입된다.
- [0049] 일례로, 시린지의 내통을 가압하기 위해 미세액적 주입 펌프 시스템을 사용할 수 있다. 도 2를 참고로, 미세액적 주입 펌프 시스템은 컬럼 용액을 수용하는 시린지의 외통을 고정하는 고정부, 실린더와 그 실린더의 내부에서 왕복운동하면서 상기 시린지의 내통을 가압하는 피스톤으로 이루어지고, 상기 고정부에 의해 고정되는 액추에이터, 상기 액추에이터를 작동시키기 위해 작동유체를 상기 실린더의 내부로 공급하는 펌프를 포함할 수 있다. 여기서, 펌프는 시린지 펌프로서, 유압장치에 의해 가압되어, 액추에이터의 실린더에 작동유체를 공급하고, 작동유체가 공급됨에 따라 피스톤이 전진운동하면서 시린지의 내통을 가압하여 시린지의 외통에 분산된 겔

미세액적을 미세액적 수송채널에 주입할 수 있다. 다만, 미세액적 주입 펌프 시스템이 반드시 상기와 같은 구성으로 구현되어야만 하는 것은 아니고, 일정한 유량으로 겔 미세액적을 주입할 수 있으면 어떠한 형태로 형성되어도 무방하다.

[0050] 한편, 미세액적 수송채널은 겔 미세액적이 통과하는 미세유체 채널이다. 여기서, 미세액적 수송채널은 단일의 겔 미세액적만 통과할 수 있도록 형성될 수 있다. 일례로, 미세액적 수송채널의 내경은, 겔 미세액적의 직경의 2배 미만으로 형성될 수 있다. 따라서, 미세액적 수송채널의 출구를 통해 겔 미세액적이 하나씩 배출되게 된다. 결국, 단일 액적 수준에서 겔 미세액적을 선별할 수 있다. 이를 통해 미세조류 균주의 선별 효율을 극대화하고, 우수한 바이오매스 생산성을 나타내는 돌연변이 균주를 캡슐화한 미세액적을 용이하게 선별할 수 있다.

[0052] 이하에서는 구체적인 실시예를 통해 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0054] 실시예 1: 미세조류 균주

[0055] 실험에 사용된 균주는 *Chlamydomonas* Resource Center (University of Minnesota)에서 구매한 *Chlamydomonas reinhardtii*의 야생형 균주인 CC-125이다. 미세조류 중 *C. reinhardtii*는 게놈 프로젝트를 수행한 최초의 조류이다. 최소 샘플 부피로 신속한 분석을 위해 UV-1800 UV 분광 광도계(Shimadzu, Japan)를 사용하여 800nm에서 광학 밀도(OD)를 측정하여, 배양 중 세포 농도를 모니터링했다. 배양된 미세조류의 초기 농도는 OD₈₀₀을 기준으로 0.05로 결정되었다.

[0057] 실시예 2: 미세액적 생성 및 보관용 미세유체 장치 제작

[0058] 미세액적 생성 및 보관을 위한 미세유체 장치의 구조는 AutoCAD (Autodesk, USA) 프로그램으로 디자인한 것을 포토마스크로 인쇄하였다(Han & All Technology, Korea). 실리콘 웨이퍼 및 네거티브 감광제(negative photoresist)인 SU-8 50(Microchem, USA)을 사용하여 일반적인 포토리소그래피(photolithography) 기법을 적용해 마스터몰드(master mold)를 제작하였다. Sylgard 184와 경화제(Dow Corning, USA)를 10:1의 질량비로 혼합하여 SU-8 마스터몰드에 붓고 진공펌프를 사용하여 혼합물에 포함된 공기를 빼내었다. 80℃ 오븐에서 12시간 이상 경화시킨 후, PDMS 판(slab)을 실리콘 웨이퍼에서 떼어내고 biopsy punch로 직경 1mm의 입구(inlet)와 출구(outlet)를 만들었다. 그런 다음 산소 플라즈마(oxygen plasma) 처리를 하고, 슬라이드 글라스와 PDMS 판을 화학적으로 결합시켜 미세유체 장치를 제작하였다. 그리고, 채널 표면의 소수성을 증대시키기 위해, 완성된 미세유체 장치를 120℃ 오븐에서 하룻밤 이상 보관하였다.

[0060] 실시예 3: 겔 미세액적 생성

[0061] 60℃의 HEPES(N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulfonic acid) 배지에 돼지 피부 젤라틴(gelatin from porcine skin)(G1890, Sigma-Aldrich)을 혼합하여 5% 용액을 제조하였다. 그 용액을 세포 현탁액과 혼합하여, 최종 세포 밀도가 5×10^5 cells/ml이고, 총 겔 농도가 2%인 분산상(dispersed phase) 유체를 제조하였다. 연속상(continuous phase) 유체로는 0.1%(w/w) Pico-Surf 계면활성제(Dolomite)를 포함하는 저점도 플루오르화 오일(fluorinated oil, HFE-7500)을 사용했다. 겔화가 되지 않도록, 핫 플레이트(hot plate)와 튜빙 히터(tubing heater)를 사용하여 분산상 유체가 담긴 용기와 연결 튜브의 온도를 30℃로 유지하였다. 미세유체 흐름 제어 시스템(MFCSTMFluigent)을 사용하여, 실시예 2에서 제작된 미세유체 장치의 내부에 분산상 유체 및 연속상 유체를 각각 400mbar 및 320mbar로 주입하여, 미세액적을 생성하였다.

[0062] 미세액적 내부에서 미세균주를 3일 동안 배양 후, 원심분리에 앞서 미세액적을 겔화하였다. 미세액적의 겔화는, 미세액적을 생성하고 그 내부에 보관 중인 미세유체 장치를 4℃에서 24시간 동안 인큐베이션하는 방식으로 온도를 제어하여 수행하였다.

[0063] 도 3은 실시예 3에 따라 미세액적을 겔화한 후 촬영한 미세유체 채널의 이미지이고, 도 4는 실시예 3에 따라 미세유체 채널에 오일(oil)을 주입하여 겔 미세액적을 회수한 후 촬영한 미세유체 채널의 이미지이다. 도 3과 같이, 미세유체 채널 내에서 겔화된 미세액적은 굴절률의 차이로 인해 매우 혼탁하였다. 겔 미세액적을 회수하기 위해, 시린지를 이용해 추가적으로 유상(oil phase)을 주입하여 미세유체 장치의 출구로 미세액적을 배출하

었다. 그 결과, 도 4와 같이, 미세유체 채널 내부가 투명하게 관찰되었다.

[0064] 한편, 오일에 물이 유화된 형태의 W/O(Water-in-oil) 미세액적은 수상(water phase)에서 원심분리하여 분리하기 어렵다. 왜냐하면, 플루오로카본 오일(fluorocarbon oil)(HFE-7500, $\rho=1.614 \text{ g/cm}^3$)은 밀도가 높고, 그 에멀전은 상대적으로 안정성이 낮기 때문이다. 이러한 기술적 제약을 극복하기 위해서, 본 발명은 온도에 의해 겔화할 수 있는 겔 기반 미세액적을 도입하였다.

[0065] 도 5는 실시예 3에 따라 온도를 제어하지 않고 생성한 겔 미세액적의 크기 분포(a) 및 온도를 제어하여 생성한 겔 미세액적의 크기 분포(b)를 각각 나타내는 도면이다. 겔 미세액적은 실온에서 부분적으로 겔화가 일어나므로 순수한 미세액적보다 그 점도가 높다. 이 경우, 수상(aqueous phase)은 액적 생성 시 불균일하게 분산될 가능성이 있다. 따라서, 동일한 유동 압력 조건에서도 $68 \sim 115 \mu\text{m}$ 범위의 불균일한 직경을 가지는 미세액적이 형성되었다(도 5의 (a) 참조). 균일한 크기의 겔 미세액적을 얻기 위해, 겔 수상(gel aqueous phase)이 통과하는 튜브 및 용기를 포함하는 실시예 2에 따른 미세유체 장치의 온도를 30°C 로 유지하였다. 이를 통해, 평균 직경이 $80.22 \mu\text{m}$ 인 미세액적을 얻을 수 있었고, 온도 제어가 없는 경우와 비교하면 평균 편차가 76.55%(15.35%에서 3.6%) 감소하였다(도 5의 (b) 참조).

[0067] 실시예 4: 겔 미세액적의 원심분리

[0068] Percoll을 1.5M NaCl 용액에 1:9(v/v) 비율로 첨가하여 Percoll 스톱 용액(SIP)을 제조했다. 그 다음, SIP를 0.15M NaCl 용액과 3:10(v/v)의 비율로 혼합하여 밀도 1.04 g/ml 의 Percoll 용액을 제조하였다. $500 \mu\text{l}$ Percoll 용액을 시린지 밸브(PN. 031915, Trajan Scientific)가 장착된 1ml 시린지에 로딩하고, -20°C 에서 동결시킨 후, 4°C 에서 24시간 동안 서서히 해동시켜, 밀도 구배를 가지는 컬럼 용액을 제조하였다.

[0069] 도 6은 실시예 4에 따른 밀도 구배 컬럼 내 밀도 마커 비드(녹색: $\rho=1.02$, 주황색: $\rho=1.04$)의 분포를 나타내는 것으로, SIP 용액의 밀도 분포를 확인하기 위해서, 녹색(밀도: 1.02 g/ml) 및 주황색(밀도: 1.04 g/ml) 밀도 마커 비드를 각각 $5 \mu\text{l}$ 의 밀도 구배에 로딩하였다. 밀도 구배 컬럼의 전체 높이는 52mm이고, 상단 및 하단의 밀도는 각각 1.0 및 1.06이었다.

[0070] 밀도 구배에 W/O 미세액적을 로딩하기 위해서는 미세액적의 표면을 둘러싼 유상(oil phase)을 제거하여, 미세액적을 수상(aqueous phase)으로 바꾸어야 한다. 미세액적은 수상(aqueous phase)에서 불안정할 수 있으므로, 미세액적을 겔화한 후에 상전이를 진행하였다. 겔화 후, 겔 미세액적을 회수한 후에, 피펫을 이용하여 겔 미세액적이 분산된 유상(oil phase)을 먼저 제거하고, 겔 미세액적이 적층된 액적층 상부에, Emulsion breaking solution의 한 종류인 Pico-Break(SF-000156, Sphere Fluidics)을 1:1000의 부피비로 첨가하였다. Pico-Break이 적층된 모든 미세액적을 통과하여 바닥으로 가라앉으면, 미세액적을 둘러싸는 유상(oil phase)의 피막이 분해되고, 이로써 미세액적이 수상(aqueous phase)으로 전이된다. 이렇게 상전이된 미세액적을 세척했다. 여기서, 겔이 녹지 않도록, 모든 공정은 10°C 이하에서 진행하였다. 도 7은 실시예 4에 따른 유상(oil phase)에서 수상(aqueous phase)으로 상전이되는 겔 미세액적의 현미경 이미지이다.

[0071] W/O 미세액적은 밀도가 낮고 유상(oil phase)과의 비호환성으로 인해 유상(oil phase)의 상부에 별도로 위치하는 반면, 상전이된 겔 수중수(water-in-water, W/W) 미세액적은 수상(aqueous phase) 내에 고르게 분포된다. 미세액적이 유상(oil phase) 내에 존재할 때에는 미세액적의 경계가 명확하게 보이지만, 수상(aqueous phase)으로 상전이된 후에는 그 경계가 불분명하다. 그러나 겔 미세액적은 수상(aqueous phase)에서도 안정적으로 그 경계를 유지하였다.

[0072] 미세액적을 피펫을 사용하여 시린지 내의 밀도 구배 컬럼의 상층에 로딩하였다. 미세액적이 분산된 수상(aqueous phase)의 원심분리는 상대적으로 무거운 미세액적을 하층에 가라앉히기 위한 것이다. 즉, 간단한 온도 제어만으로 미세액적을 겔화하고, 원심분리를 통해 다량의 미세액적을 밀도 차이에 따라 분리할 수 있다. 다양한 세포 농도의 미세액적을 밀도 구배 컬럼에 로딩하고, 밴드 밴드 강도(band intensity)를 측정하였다. 도 8은 실시예 4에 따라 원심분리 20분 후 상층에서부터 깊이에 따른 밀도 구배 컬럼의 밴드 강도(band intensity), 및 겔 미세액적의 분포를 나타낸다. 도 8을 참고로, 원심분리 전 미세액적이 즉시 가라앉지 않기 때문에 상층에서 높은 밴드 강도가 측정되었고, 원심분리 20분 후에는 미세액적이 밀도 구배 컬럼에 분산되면서, 초기와 다른 밴드 강도를 나타냈다.

[0073] 그 시린지를 스윙 버킷 로터(swinging bucket rotor)에 고정하고, $400 \times g$ 에서 5분 동안 원심분리하고, 원심분

리 전후 밴드 강도를 비교하였다. 도 9는 실시예 4에 따른 원심분리 전후 깊이에 따른 밀도 구배 컬럼의 밴드 강도(band intensity)를 비교한 결과이다. 원심분리 후, 미세액적은 그 밀도에 대응되는 밀도 구배 컬럼의 특정 위치에 분포되었다. 이때, 상대적으로 높은 세포 농도를 가진 미세액적은 밀도 구배 컬럼의 하층에 위치하므로, 밴드 강도는 밀도 구배 컬럼의 상부에서 하부로 갈수록 증가하면서 넓은 범위의 액적 분포를 나타냈다.

[0075] 실시예 5: 겔 미세액적이 주입된 미세유체 채널의 형광 광도 측정

[0076] 도 2를 참고로, 겔 미세액적을 원심분리한 후, 밀도 구배 컬럼을 수용하는 시린지의 하부에 장착된 밸브를 통해, 밀도 구배 컬럼에 분포된 미세액적을 미세유체 채널에 순차적으로 주입하였다. 여기서, 미세유체 채널은 단일 미세액적만 통과할 수 있는 크기를 가진다. 시린지 펌프의 유속은 0.5ml/min으로 설정하였다. 미세액적을 주입하고 50, 95 및 110초 경과한 시점에 미세액적의 현미경 이미지 및 형광 이미지를 획득하였다. 미세유체 채널의 형광 강도를 측정하기 위해서, 127초 동안 5초 간격으로 형광 이미지를 얻었고 ImageJ를 사용하여 각 이미지의 형광 강도를 측정했다. 모든 형광 이미지는 형광 현미경(Eclipse Ts2-FL Diascopic and Epi-fluorescence illumination model, Nikon)과 전하 결합 소자(CCD) 카메라를 사용하여 캡처하였다.

[0077] 도 10은 실시예 5에 따른 미세액적의 미세유체 채널 통과 시간에 대한 형광 활성을 나타내는 도면이고, 도 11은 실시예 5에 따른 미세유체 채널 주입 후 50초(1st out), 95초(2nd out) 및 110초(3rd out) 경과 시점에서 미세유체 채널에서 배출된 미세액적의 형광 강도 분포를 나타낸다.

[0078] 밀도 구배의 바닥에서 미세액적을 추출함에 따라 세포 밀도가 높은 미세액적이 먼저 회수되고, 세포 밀도가 낮은 순으로 나중에 회수된다. 이는 시간이 경과함에 따라 미세유체 채널 내에서 엽록소 형광 강도가 감소하는 것을 통해 확인할 수 있다(도 10 참조). 엽록소 형광 강도는 미세유체 채널의 특정 지점에서 세포 농도를 나타낸다. 또한, 회수 시간이 증가함에 따라 미세유체 채널의 출구에서 배출되는 미세액적의 평균 형광 강도가 82.40에서 0.49로 감소하였다(도 11 참조). 특히, 1차 회수된 미세액적과 2차 회수된 미세액적 사이의 형광 강도 편차는 각각 4.1% 및 8.1%로 높은 미세액적 회수 수율을 나타낸다.

[0079] 선별 효율을 평가하기 위해서, 수동 또는 미세유체 채널에 의해 회수된 미세액적에서 선택된 균주의 성장을 비교하였다. 도 12는 비교예에 따라 수동으로 미세액적을 회수하는 순서에 따른 돌연변이 균주의 OD₈₀₀ 값을 나타내는 박스 플롯(box plot)이고, 도 13은 실시예 5에 따라 미세액적 주입 펌프 시스템으로 미세액적을 미세유체 채널에 주입하여 배출된 순서에 따른 돌연변이 균주의 OD₈₀₀ 값을 나타내는 박스 플롯(box plot)이다.

[0080] 도 12와 같이, 밀도 구배 컬럼을 수용하는 시린지의 내통을 손으로 가압하여 미세액적을 배출시켜 회수하는 수동 회수의 경우, 미세액적의 회수가 늘어감에 따라 돌연변이 균주의 전체 세포 성장이 감소하였다. 또한, 동시에 회수된 돌연변이 균에서도 돌연변이체 간의 성장 편차가 상당히 크게 나타났다. 이는 수동으로 시린지의 내통을 가압하는 경우에 미세액적이 급격히 방출되고, 이로 인해 밀도 구배에 분포된 미세액적의 배열에 영향을 미쳐, 미세액적 간의 부분적인 혼합을 초래했기 때문으로 판단된다. 따라서, 수동 회수의 경우에는 선별 효율이 낮아질 수밖에 없다.

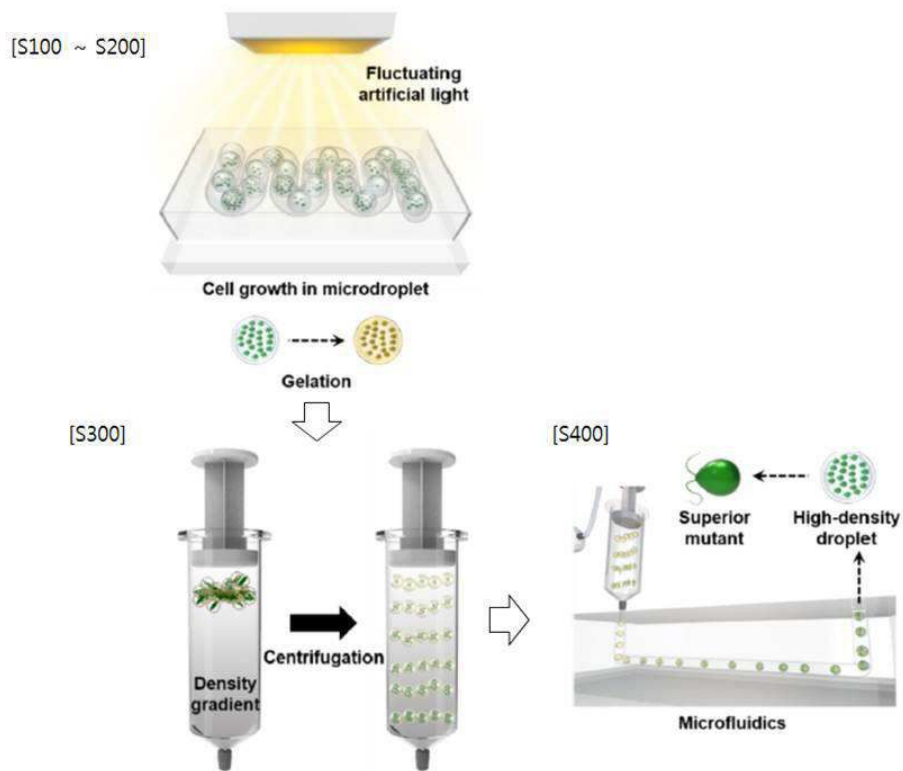
[0081] 한편, 도 13을 참고로, 미세유체 채널을 통해 미세액적을 수집하는 경우, 돌연변이 균주 간의 성장 편차가 16.68%에서 7.83%로 급격히 감소하였다. 최초 회수된 균주는 가장 높은 평균 성장(OD₈₀₀=1.152)을 나타냈고, 평균 성장은 회수 시간이 증가함에 따라 감소했다. 마지막으로 회수된 균주(OD=0.156)는 초기 균주에 비해 성장이 86.43% 감소한 것으로 나타났다. 특히, 최초 회수 시 수득된 모든 돌연변이 균주는 WT 균주와 비교할 때에 개선된 세포 성장을 나타냈다.

[0083] 이상 본 발명을 구체적인 실시예를 통하여 상세히 설명하였으나, 이는 본 발명을 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명은 이에 한정되지 않으며, 본 발명의 기술적 사상 내에서 당 분야의 통상의 지식을 가진 자에 의해 그 변형이나 개량이 가능함이 명백하다.

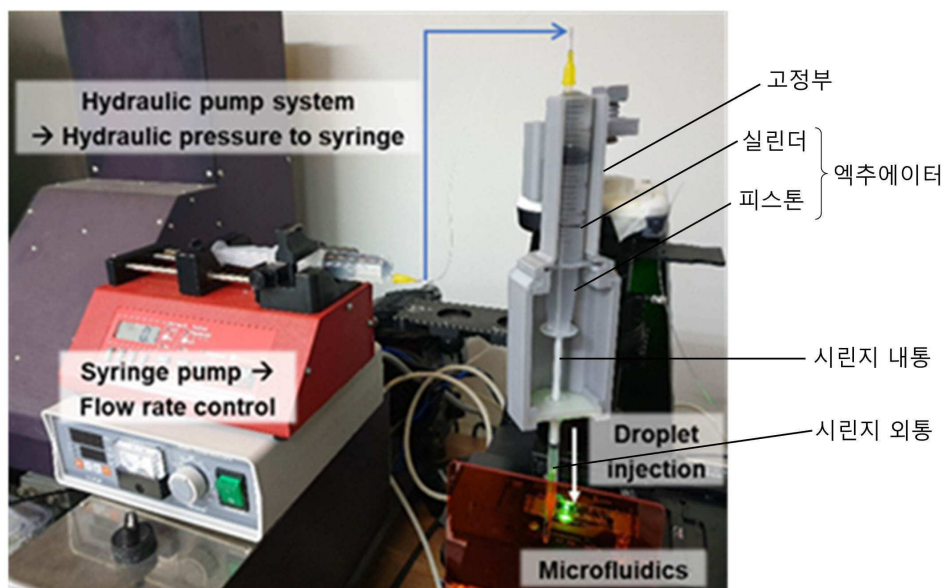
[0084] 본 발명의 단순한 변형 내지 변경은 모두 본 발명의 영역에 속한 것으로 본 발명의 구체적인 보호 범위는 첨부된 특허청구범위에 의하여 명확해질 것이다.

도면

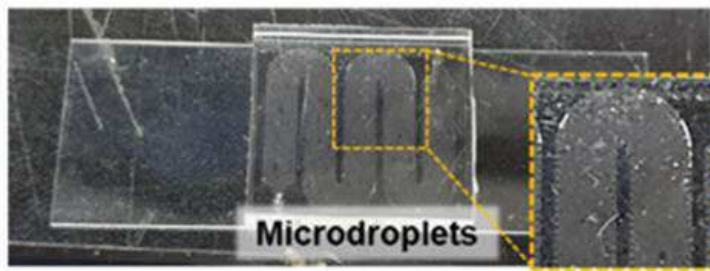
도면1



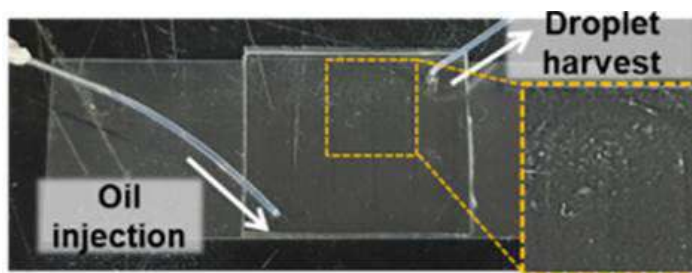
도면2



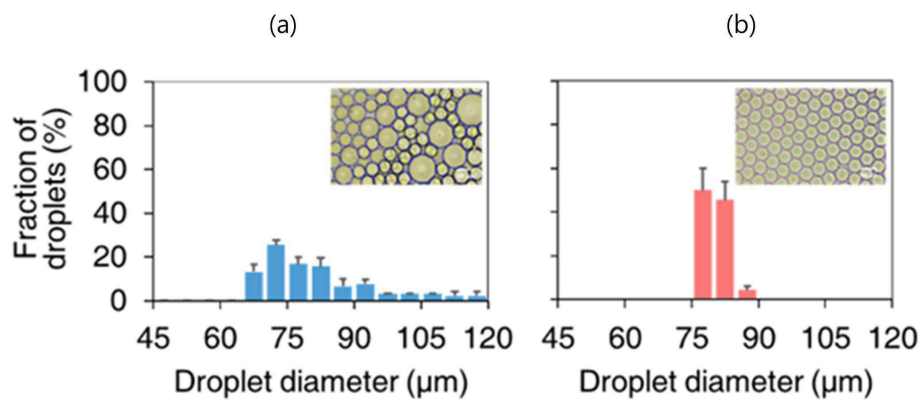
도면3



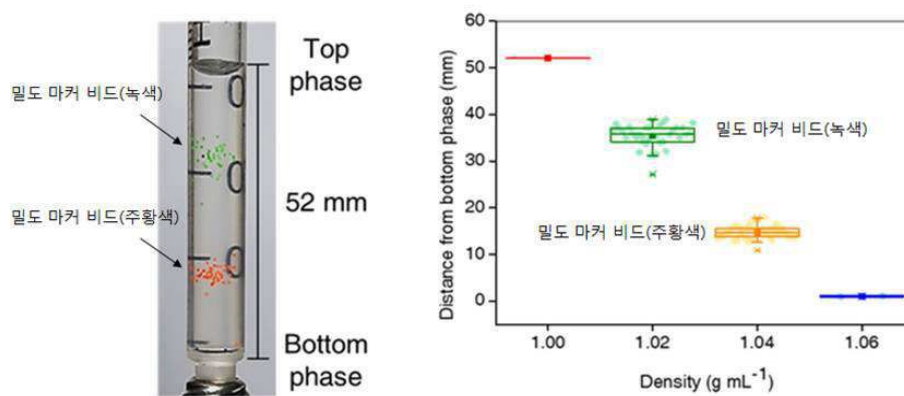
도면4



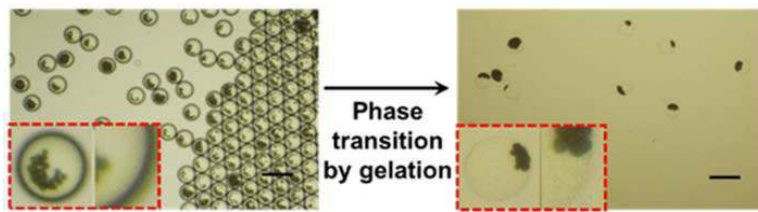
도면5



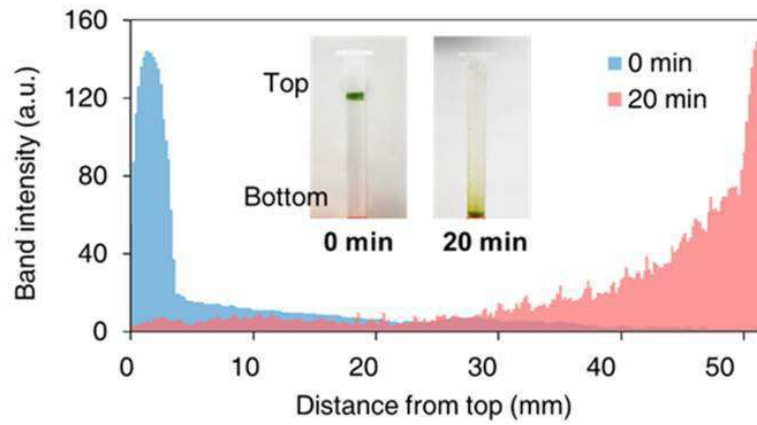
도면6



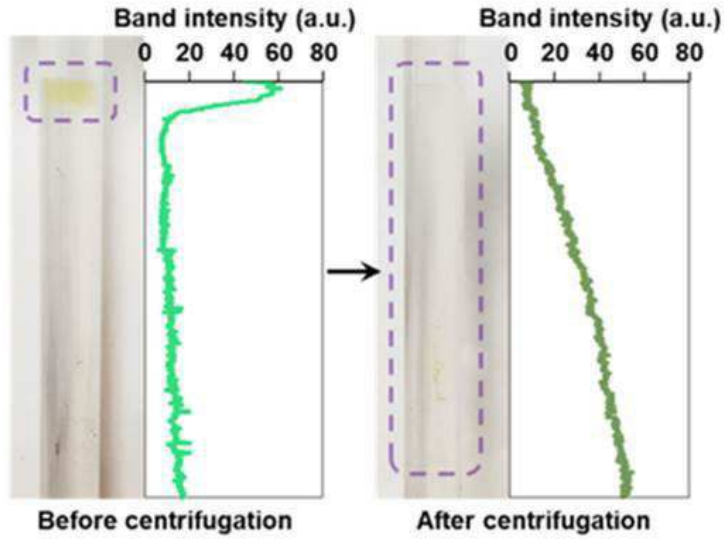
도면7



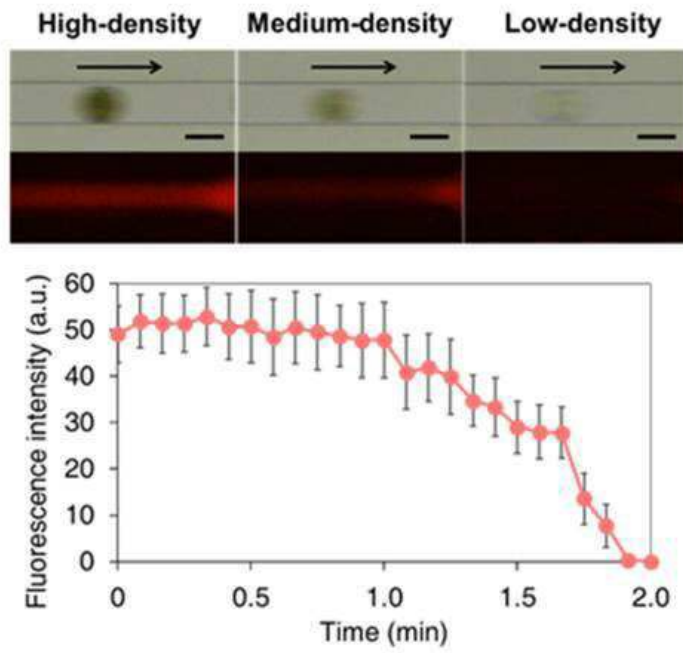
도면8



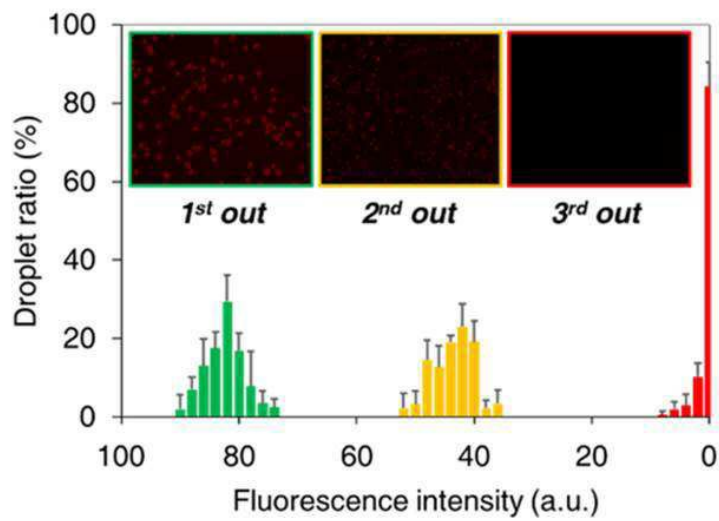
도면9



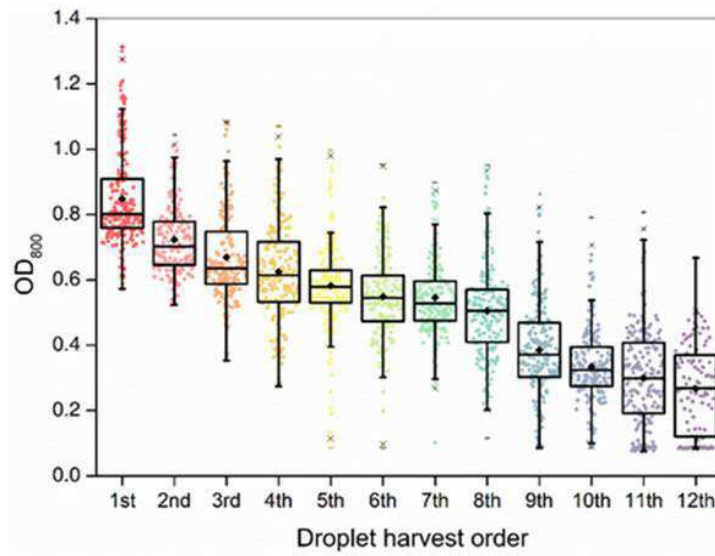
도면10



도면11



도면12



도면13

