



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0094143
(43) 공개일자 2014년07월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/04 (2006.01) G01N 35/08 (2006.01)
G01N 21/76 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0006466
(22) 출원일자 2013년01월21일
심사청구일자 2013년01월21일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
심상준
서울 강남구 선릉로 221, 301동 803호 (도곡동, 도곡텍슬아파트)
김영환
서울 성북구 안암로 145, 자연캠퍼스 창의관 513호 (안암동5가, 고려대학교)
곽호석
서울 성북구 안암로 145, 자연캠퍼스 창의관 513호 (안암동5가, 고려대학교)
(74) 대리인
박원미

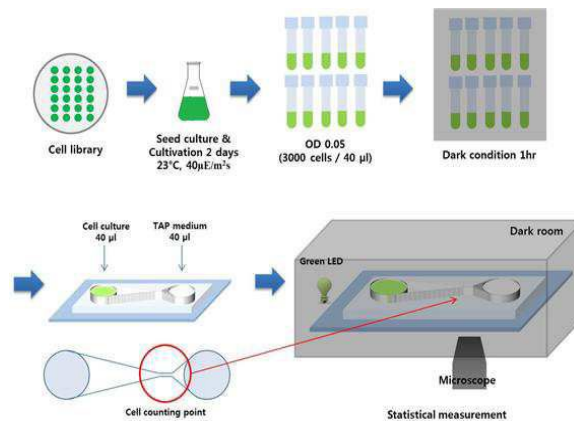
전체 청구항 수 : 총 24 항

(54) 발명의 명칭 돌연변이가 유발된 단세포 생물체의 선별방법 및 이에 사용되는 미세유체 장치

(57) 요약

본원은 미세유체 광반응 장치 및 광반응 특성이 변화된 단세포 생물체를 선별하는 방법을 개시한다. 본원 발명은 주광성을 이용하여 개량된 단세포 생물체를 미세유체 시스템을 이용하여 효과적으로 선별할 수 있는 것으로, 세포 단위에서 용이한 모니터링이 가능하고, 수집한 결과의 통계적 분석을 포함한 다양한 분석을 통해 변화된 광반응성 및/또는 광민감성을 갖는 돌연변이 균주를 쉽게 또한 고속으로 선별할 수 있어, 주광성 및 광전환 효율의 상관관계 규명, 광전환 효율이 향상된 개량된 단세포 생물체 선별에 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-0031997

부처명 교육과학기술부

연구사업명 거대과학연구개발사업(Korea CCS 2020사업)

연구과제명 생물학적 이산화탄소 고속전환 유기 자원화 기술

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2012.06.01 ~ 2013.05.31

특허청구의 범위

청구항 1

주광성을 이용한 돌연변이 단세포 생물체의 선별방법으로, 상기 방법은

단세포 생물체에 광을 조사하여 주광성을 유발하는 단계;

상기 단세포 생물체의 주광성 지표를 산출하는 단계; 및

대조군과 비교하여, 상기 단세포 생물체의 주광성 지표가 변화된 경우, 이를 목적하는 돌연변이가 유발된 단세포 생물체로 선별하는 단계를 포함하는, 주광성을 이용한 돌연변이가 유발된 단세포 생물체 선별 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 방법은 상기 주광성을 유발하는 단계 전에 상기 단세포 생물체를 지속적 광조건에 배양한 후, 상기 단세포 생물체를 암조건에서 배양하는 전처리 단계를 추가로 포함하는 것인, 돌연변이가 유발된 단세포 생물체 선별 방법.

청구항 3

제 2 항에 있어서,

상기 지속적 광조건은 540 ~ 600 nm 또는 430 ~ 500 nm 파장을 갖는 20 ~50 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 세기의 광을 12 내지 24 시간 동안 조사하는 것인, 돌연변이가 유발된 단세포 생물체 선별 방법.

청구항 4

제 2 항에 있어서,

상기 전처리 단계의 배양은 대수증식기 (exponential phase) 까지 배양하는 것인, 돌연변이가 유발된 단세포 생물체 선별 방법.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 단세포 생물체는 단일 콜로니 유래 또는 다수의 콜로니 유래인 것인, 돌연변이가 유발된 단세포 생물체 선별 방법.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 주광성은 음성 또는 양성 주광성인, 돌연변이가 유발된 단세포 생물체 선별 방법.

청구항 7

제 6 항에 있어서,

상기 주광성은 음성 주광성으로, 상기 음성 주광성은 540 ~ 600 nm 또는 430 ~ 500 nm 파장의 빛을 20 내지 50 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{cm}^{-1}$ 광도의 조사에 의해 유발되는 것인, 돌연변이가 유발된 단세포 생물체 선별 방법.

청구항 8

제 1 항에 있어서,

상기 주광성지표는 광반응성 또는 광민감성 중 하나 이상의 측정을 통해 산출되는 것인, 돌연변이가 유발된 단세포 생물체 선별 방법.

청구항 9

제 1 항에 있어서,

상기 목적하는 돌연변이가 유발된 단세포 생물체는 대조군과 비교하여 광합성 색소를 포함하는 광합성 기구의 변화, 광합성 효율, 또는 광전환 효율을 포함하는 광합성 지표, 또는 성장속도 중 하나 이상이 개선된 것인, 돌연변이가 유발된 단세포 생물체 선별 방법.

청구항 10

제 1 항에 있어서,

상기 주광성 지표는,

상기 방법에 사용된 총 단세포 생물체 수에 대한 주광성에 반응하여 단위 시간당 이동한 단세포 생물체 수의 비;

단위 시간 당 이동한 단세포 생물체 수의 분포를 기초로 한 히스토그램 정점 분석 ; 및

상기 방법에 사용된 단세포 생물체의 단위 거리당 이동에 소요된 평균 시간, 또는 속도 또는 그 편차를 포함하는 것인, 돌연변이가 유발된 단세포 생물체 선별 방법.

청구항 11

제 1 항에 있어서,

상기 방법은 선별된 돌연변이 단세포 생물체에 대하여 광합성 지표를 추가로 분석하는 단계를 포함하는 것인, 돌연변이가 유발된 단세포 생물체 선별 방법.

청구항 12

제 11 항에 있어서, 상기 광합성 지표는 광합성 색소를 포함하는 광합성 기구의 변화, 광합성 효율, 광전환 효율을 포함하는 것인, 돌연변이가 유발된 단세포 생물체 선별 방법.

청구항 13

제 1 항에 있어서,

상기 단세포 생물체는 미세조류인, 돌연변이가 유발된 단세포 생물체 선별 방법.

청구항 14

제 13 항에 있어서,

상기 미세조류는 녹조류, 규조류, 홍조류, 편모류, 담록조류, 갈색 편모조류, 황녹색조류, 와편모류, 또는 남조류인, 돌연변이가 유발된 단세포 생물체 선별 방법.

청구항 15

제 14 항에 있어서,

상기 미세조류는 *Chlamydomonas spp.*, *Rhodomonas spp.*, *Chroomonas spp* 중 하나 이상을 포함하는 갈색 편모조류인, 돌연변이가 유발된 단세포 생물체 선별 방법.

청구항 16

제 15 항에 있어서,

상기 갈색 편모조류는 클라미도모나스 레인하르티아이(*Chlamydomonas reinhardtii*)인, 돌연변이가 유발된 단세포 생물체 선별 방법.

청구항 17

제 1 항 내지 제 16 항 중 어느 한 항의 방법에 따라 선별된 돌연변이 단세포 생물체.

청구항 18

광투과성 개체 유입부;

상기 개체 유입부와 별개로 형성되는 개체 도달부;

상기 개체 유입부 및 상기 개체 도달부에 유체 소통가능하게 연결된 채널부; 및

상기 채널부의 양 말단 사이에 형성된 계측부를 포함하는, 미세유체 광반응 장치.

청구항 19

제 18 항에 있어서,

상기 계측부는 상기 채널부의 직경보다 같거나 작게 형성되는 것인, 미세유체 광반응 장치.

청구항 20

제 19 항에 있어서,

상기 계측부의 직경은 상기 개체 유입부에 도입된 개체 운동의 개별적 관찰이 가능한 크기로 형성되는 것인, 미세유체 광반응 장치.

청구항 21

제 19 항에 있어서,

상기 계측부의 직경은 10 μ m 내지 100 μ m 인, 미세유체 광반응 장치.

청구항 22

제 18 항에 있어서,

상기 미세유체 광반응기는 광원을 추가로 포함하는 것인, 미세유체 광반응 장치.

청구항 23

제 22 항에 있어서,

상기 광원은 LED 또는 레이저 다이오드를 포함하는, 미세유체 광반응 장치.

청구항 24

제 18 항에 있어서, 상기 장치는 제 1 항 내지 제 17 항 중 어느 한 항에 따른 방법에 사용되는 것인, 미세유체 광반응 장치.

명 세 서

기술 분야

[0001] 본원은 목적하는 특징을 갖는 돌연변이가 유발된 단세포 생물체 선별 기술에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 박테리아, 효모, 및 미세조류를 포함하는 여러 단세포 생물체는 농업, 축산, 수산, 의약 및 자원 분야에서 다양한 목적으로 이용된다. 예를 들면 박테리아 및 효모는 의약품 단백질 발현에 널리 사용되며, 특히 미세조류는 광에너지와 이산화탄소 및 무기물질로부터 바이오디젤로 전환이 가능한 중성지질을 다량 생산할 수 있는 능력이 있어 근래 화석연료 사용량의 급증으로 인한 에너지자원 고갈문제 및 온실가스 배출에 따른 지구온난화 문제를 해결할 수 있는 대안의 하나로 주목받고 있다.

[0003] 미세조류는 클로로필, 카로티노이드, 파이코빌린스 등과 같은 색소를 함유하고 있으며 광합성을 통해 세포성장 및 이에 필요한 유기물질을 합성할 수 있는 단세포성 조류를 미세조류 (microalgae)라 하며, 대부분의 식물성

플랑크톤이 이에 속한다. 현재까지 수십만 종이 넘는 미세조류가 담수 및 해양생태계에 존재하는 것으로 보고되고 있으며 여러 목적을 위해 연구개발이 시도되고 있으나 유전자조작의 한계 등으로 인하여 생산성 향상을 위한 균주개량 등에 많은 어려움에 직면해 있다.

- [0004] 이러한 미세조류의 효율적 이용을 위해, 목적에 맞는 최적의 균주개발, 배지 최적화, 최적 반응기 설계, 대사공정과 생산물 정제 등을 위한 연구가 필요하다.
- [0005] 이 중 최적의 균주를 개발하는 방법 중의 하나가 미세조류의 유전체에 특정 또는 무작위 돌연변이를 유발한 후, 목적하는 성질 예를 들면 광합성 효율 증대, 높은 지질 생산량 또는 신속한 생장속도와 같은 특징을 나타내는 균주를 발굴하는 것이다.
- [0006] 미국 공개특허 공보 제2008-00254493호는 단백질 분해효소를 발현하지 않는 돌연변이 미생물 균주의 선별 방법에 관한 것으로, 돌연변이가 발생된 균주를 단백질 분해효소의 기질이 포함된 젤 상에서 배양하여, 기질의 분해 여부를 통한 돌연변이 균주를 선별하는 것에 관하여 개시하고 있다.
- [0007] 대한민국 공개특허 공보 제2011-0018798호는 미세유체 세포칩, 이를 이용한 세포사멸 정량 분석법 및 세포영상 분석장치에 관한 것으로, 미세유체 시스템을 이용하여 세포사멸을 실시간으로 분석 및 영상화 할 수 있는 장치 및 방법을 개시하고 있다.
- [0008] 하지만 이는 많은 경우 복잡한 생화학적 및 분자생물학적 분석이 수반되는 수만 개의 균주에 대한 스크리닝을 요구한다. 따라서 스크리닝 초기 단계에서 균주를 고속 선별할 수 있는 방법의 개발이 요구된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본원은 목적에 부합하는 개량된 광반응성 등의 특징을 갖는, 유전자의 변이가 유발된 최적의 단세포 생물체를 신속하고 효율적으로 선별할 수 있는 방법 및 장치를 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0010] 한 양태에서 본원은 주광성을 이용한 목적하는 돌연변이가 유발된 단세포 생물체의 선별방법에 관한 것이다. 일 구현예에서 상기 방법은 단세포 생물체에 광을 조사하여 주광성을 유발하는 단계; 상기 단세포 생물체의 주광성 지표를 산출하는 단계; 및 대조군과 비교하여, 상기 단세포 생물체의 주광성 지표가 변화된 경우, 이를 목적하는 돌연변이가 유발된 단세포 생물체로 선별하는 단계를 포함한다.
- [0011] 본원에 따른 일 구현예에서 상기 방법은 상기 주광성을 유발하는 단계 전에 상기 단세포 생물체를 지속적 광조건에 배양한 후, 상기 단세포 생물체를 암조건에서 배양하는 전처리 단계를 추가로 포함한다. 본원에 따른 일 구현예에서 상기 지속적 광조건은 목적 및 사용되는 단세포 생물체의 종류 등과 같은 조건을 고려하여 적절하게 선택할 수 있으며, 예를 들면 미세조류를 사용하는 경우, 약 540 ~ 600 nm 또는 약 430 ~ 500 nm 파장을 갖는 약 $20 \sim 50 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 세기의 광을 약 12 내지 24 시간 동안 조사하는 것이다. 본원에 따른 일 구현예에서 상기 전처리 단계의 배양으로 단세포 생물체는 대수증식기 (exponential phase) 까지 배양된다.
- [0012] 본원의 방법에 사용되는 단세포 생물체는 단일 콜로니 유래 또는 다수의 콜로니 유래일 수 있다. 예를 들면 단일 콜로니 유래의 경우, 특성 확인, 또는 단일 콜로니의 개별적 특성 확인을 통한 최적의 특성을 나타내는 돌연변이 단세포 생물체의 선별, 또는 다수의 콜로니 혼합물이 사용되는 경우 돌연변이 라이브러리로부터 원하는 특성을 갖는 유전자 변이가 유발된 목적하는 돌연변이를 효율적 선별에 사용될 수 있다.
- [0013] 본원의 방법에 사용되는 주광성은 음성 및/또는 양성 주광성을 모두 포함하는 것이다. 본원에 따른 일 구현예에서 주광성은 음성 주광성으로, 상기 음성 주광성 유발을 위한 빛의 광도는 사용되는 구체적 단세포 생물체 종류 등과 같은 조건에 따라 변할 수 있으나, 미세조류의 경우 예를 들면 약 540 ~ 600 nm 또는 430 ~ 500 nm 파장의 빛을 약 20 내지 50 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{cm}^{-1}$ 광도로 조사하는 것이나, 이로 제한되는 것은 아니다.
- [0014] 본원에 따른 방법에서, 목적하는 돌연변이가 유발된 단세포 생물체는 대조군과 비교하여 광합성 색소를 포함하

는 광합성 기구의 변화, 광합성 효율, 또는 광전환 효율을 포함하는 광합성 지표, 또는 성장속도 중 하나 이상이 개선된 것이나, 이로 제한하는 것은 아니며, 광합성과 관련된 공지된 다양한 지표를 포함할 수 있다.

[0015] 본원에 따른 방법은 광에 대한 단세포 생물체의 반응을 기본으로 하는 것으로 본원의 주광성지표는 광반응성 또는 광민감성 중 하나 이상의 측정을 통해 산출될 수 있다. 이러한 주광성 지표는 대조군과 비교하여, 빛에 대한 반응과 관련된 변화를 측정할 수 있는 것이면 다 포함되며, 예를 들면 본 방법에 사용된 총 단세포 생물체 수에 대한 주광성에 반응하여 단위 시간당 이동한 단세포 생물체 수의 비; 단위 시간 당 이동한 단세포 생물체 수의 분포를 기초로 한 히스토그램 정점 분석 ; 및 본 방법에 사용된 단세포 생물체의 단위 거리당 이동에 소요된 평균 시간, 또는 속도 또는 그 편차를 포함하는 것이나, 이로 제한하는 것은 아니다.

[0016] 본원에 따른 다른 구현예에서 본 방법은 선별된 돌연변이 단세포 생물체에 대하여 광합성 지표를 추가로 분석하는 단계를 포함한다. 상기 광합성 지표는 광합성과 관련된 다양한 지표를 포함하는 것으로, 이로 제한하는 것은 아니나, 예를 들면 광합성 색소를 포함하는 광합성 기구의 변화, 광합성 효율, 광전환 효율을 포함한다.

[0017] 본원에는 주광성을 나타내는 다양한 단세포 생물체가 사용될 수 있으며, 예를 들면 미세조류인, 예를 들면 녹조류, 규조류, 홍조류, 편모류, 담록조류, 갈색 편모조류, 황녹색조류, 와편모류, 또는 남조류, 예를 들면 *Chlamydomonas spp.*, *Rhodomonas spp.*, *Chroomonas spp* 중 하나 이상을 포함하는 갈색 편모조류가 사용될 수 있으나 이로 제한하는 것은 아니다. 일 구현예에서 본 방법에 사용되는 갈색 편모조류는 클라미도모나스 레인하르티아이(*Chlamydomonas reinhardtii*)이다.

[0018] 다른 양태에서 본원은 또한 본 방법에 따라 선별된 돌연변이 단세포 생물체를 제공한다.

[0019] 또 다른 양태에서 본원은 광투과성 개체 유입부; 상기 세포 유입부와 별개로 형성되는 개체 도달부; 상기 개체 유입부 및 상기 개체 도달부에 유체 소통가능하게 연결된 채널부; 및 상기 채널부의 양 말단 사이에 형성된 계측부를 포함하는, 미세유체 광반응 장치를 포함한다.

[0020] 본원 장치는 상술한 주광성을 이용한 돌연변이 선별방법에 사용될 수 있으나, 이로 제한하는 것은 아니다.본원에 따른 장치에서 상기 계측부는 상기 채널부의 직경보다 같거나 작게 형성되며, 상기 계측부의 직경은 상기 개체 유입부에 도입된 개체 운동의 개별적 관찰이 가능한 크기로 형성되며, 예를 들면 계측부의 직경은 10 μ m 내지 100 μ m이나 이로 제한하는 것은 아니다.

[0021] 본원에 따른 미세유체 광반응기는 광원을 추가로 포함한다. 본 장치에 사용될 수 있는 광원은 특정 파장의 빛을 방출 할 수 있는 한 다양한 종류의 것이 사용될 수 있으며, 예를 들면 LED 또는 레이저 다이오드를 포함한다.

발명의 효과

[0022] 본원 발명은 주광성을 이용하여 개량된 단세포 생물체를 미세유체 시스템을 이용하여 효과적으로 선별할 수 있는 것으로, 세포 단위에서 용이한 모니터링이 가능하고, 수집한 결과의 통계적 분석을 포함한 다양한 분석을 통해 변화된 광반응성 및/또는 광민감성을 갖는 돌연변이 균주를 쉽게 또한 고속으로 선별할 수 있어, 주광성 및 광전환 효율의 상관관계 규명, 광전환 효율이 향상된 개량된 단세포 생물체 선별에 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 광합성 미세조류 균주들을 본원의 일 구현예에서 따른 미세유체 시스템 내에서 주광성을 이용하여 광반응이 특이적인 균주를 선별하는 전체적인 과정을 도식화한 개략도이다.

도 2a는 본원에 사용될 수 있는 다양한 예시적 미세유체 광반응 장치의 평면도이다.

도 2b는 본원의 일 구현예에서 사용된 미세유체 광반응 장치의 평면도 (상단), 사시도 (하단)이다.

도 3a는 주광성을 통한 미세조류 선별에 효과적인 빛의 파장을 결정하기 위해, 본원 일 구현예에 따라 다양한 파장의 LED를 사용하여 미세조류의 광반응을 측정한 그래프이다.

도 3b는 도 2a에 도시된 각각의 미세유체 광반응 장치를 이용하여 주광성에 의한 미세조류의 광반응을 측정한 그래프로, 그래프 상의 1, 2, 3, 4는 도 2a의 각 장치에 기재된 번호에 상응하는 것이다.

도 4는 본원의 일 구현예에서 사용된 미세조류 균주 내 클로로필 a와 클로로필 b의 비(a/b ratio)를 나타낸 그래프이다.

도 5는 본원의 일 구현예에 따른 미세유체 광반응 장치를 이용하여 광반응을 나타내는 미세조류 균주의 시간에 따른 분포를 세포 수로 나타낸 히스토그램으로, 대조군으로 사용한 야생형 (wild type)과 돌연변이 균주 군집 (colony)의 광반응 정도를 나타낸다.

도 6a는 대조군 및 돌연변이 균주 각각에서 전체 세포 수에 대한 광반응을 보인 세포 수의 비율을 통해 광반응성을 분석한 그래프이다.

도 6b는 대조군과 돌연변이 균주가 주광성에 의해 일정거리 (3 cm)를 이동하는데 소요된 평균 소요 시간의 편차를 나타낸 그래프로써, 돌연변이 균주간의 광민감도를 나타낸다.

도 7a는 클로로필 a/b 비율과 NPQ의 상관관계를 나타낸 그래프로써, 클로로필 a/b 비율이 높을수록 NPQ (non-photochemical quenching) 값이 낮은 역비례 상관관계를 나타내어 광합성 효율이 높음을 나타낸다.

도 7b는 클로로필 a/b 비율과 qP (Photochemical quenching)의 상관관계를 나타내는 그래프로써, 클로로필 a/b 비율이 높을수록 qP 값이 높은 상관관계를 나타내어 광합성 효율이 높다는 것을 나타낸다.

도 8a는 본원의 일 실시예에 따른 주광성 지표로 평균 도달 시간과 광합성 효율 측정 지표인 NPQ와의 상관관계 그래프로써, 주광성을 통해 평균 도달 시간이 빨라진 돌연변이 균주는 광합성 효율 측정 지표인 NPQ 값이 낮은 상관관계를 나타내어 광민감성이 증가된 균주는 광합성 효율이 높음을 나타낸다.

도 8b는 본원의 일 실시예에 따른 주광성 지표로 평균 도달 시간과 광합성 효율 측정 지표인 qP와의 상관관계 그래프로써, 주광성을 통해 평균 도달 시간이 빨라진 돌연변이 균주는 광합성 효율 측정 지표인 qP와 높은 상관관계를 나타내어 NPQ와 동일하게 광민감성이 증가된 균주가 광합성 효율이 높음을 나타낸다.

도 9는 주광성을 통해 일정시간(5분) 간 일정거리(3cm)를 이동하는 세포 수를 대조군의 세포 수로 나눈 값을 나타낸 이동 세포 개체수 비율과 NPQ와의 상관관계를 비교한 그래프이다. 이는 값이 1 이상인 돌연변이 균주는 일정시간 동안 대조군 균주에 대비하여 더 많은 세포수가 이동한 것으로, 광민감성 및 광반응성이 우수한 돌연변이가 유발된 균주를 나타내며, 이러한 균주는 NPQ 값이 낮은 상관관계를 나타내므로, 광합성 효율이 증가된 균주임을 나타낸다.

도 10은 본원의 일 구현예에 따른 미세유체 광반응 장치를 이용하여 주광성에 의한 미세조류의 실제 움직임을 보여주는 광학현미경(X40) 이미지이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0024] 본원은 운동성을 지닌 광합성 단세포 생물체에서 개량된 광반응성을 갖는 돌연변이체를 주광성의 차이를 통해 효과적으로 선별할 수 있다는 발견에 근거한 것으로, 구체적으로 단세포 생물체가 지닌 광민감성 및/또는 광반응성의 차이를 이용하여 미세유체 시스템 내에서 돌연변이가 유발된 세포의 개체별 운동의 통계적 분석을 통해 빛에 대한 광반응이 특이적으로 변화된 특징을 지닌 돌연변이가 유발된 균주를 신속하고 효율적으로 선별할 수 있음을 발견하였다.
- [0025] 따라서 한 양태에서 본원은 주광성을 이용한 돌연변이 단세포 생물체의 선별방법에 관한 것이다. 본원에 따른 방법은 단세포 생물체에 광을 조사하여 주광성을 유발하는 단계; 상기 단세포 생물체의 광민감성 및 광반응성을 측정하여 주광성 지표를 산출하는 단계; 대조군과 비교하여, 상기 주광성 지표가 변화된 경우, 이를 목적하는 돌연변이가 유발된 단세포 생물체로 선별하는 단계를 포함한다.
- [0026] 본원에서 사용된 용어 "단세포 생물체", "세포" 또는 "균주"는 상호 교환적으로 사용되며, 이는 운동성이 있으며 빛에 대해 반응, 주광성을 나타내는 다양한 단세포 생물을 일컫는 것으로 예를 들면 광합성 세균 또는 박테리아, 광합성을 할 수 있는 유글레나와 같은 원생동물 또는 미세조류를 포함한다. 한 구현예에서는 특히 대표적으로 미세조류인 클라미도모나스 레인하르티아(*Chlamydomonas reinhardtii*)가 사용된다.
- [0027] 본원에서 사용된 용어 "주광성"은 빛에 반응한 단세포 생물체의 운동으로 빛을 따라 이동하는 양성 주광성 또는 빛을 피해 이동하는 음성 주광성을 모두 포함하는 것이며, 특정 광량에서는 양성 주광성을 나타내는 경우라도, 빛의 광도가 일정 강도를 넘는 경우 음성 주광성을 나타내는 경우도 있다.
- [0028] 본원에서 사용된 용어 "돌연변이"는 변이가 유발되지 않은 대조군과 비교하여 유전자 수준에서 변이가

발생하여, 이러한 변이로 인해 표현형 특히 주광성, 광반응성 및/또는 광민감도 등의 특징에 차이가 유발된 것으로, 자연에서 발견되는 돌연변이는 물론 인위적으로 도입된 돌연변이를 모두 포함하는 것이다. 돌연변이는 무작위 또는 특정 위치에서 발생한 돌연변이, 유전자를 이루는 뉴클레오타이드의 부가, 결실, 및/또는 치환 등에 의한 돌연변이를 모두 포함하는 것이다.

[0029] 본원에서 사용된 용어 "목적하는 돌연변이" 또는 "목적하는 특성을 갖는" "목적하는 특징이 유발된 돌연변이"는 상기와 같은 유전적 변화로 인해서 단세포 생물체에서 개량하고자 하는 하나 이상의 특징이 변화 예를 들면 개선, 향상된 것으로, 단세포 생물체의 최종 용도에 따라 다양한 특성이 포함될 수 있다. 예를 들면 단세포 생물체로서 미세조류가 사용되는 경우, 광합성과 관련된 특성 또는 지표, 예를 들면 광합성 색소를 포함하는 광합성 기구의 변화, 광합성 효율, 광전환 효율을 포함하며, 그 외 성장속도의 변화, 지질함량 및/또는 지질성분의 변화 등을 포함할 수 있으나 이로 제한하는 것은 아니다. 개선된 정도를 파악하기 위해, 돌연변이가 유발된 단세포 생물체에서 상응하는 특성과 비교할 수 있으며, 당업자라면, 개선된 특징을 고려하여 적절한 기준을 선택할 수 있을 것이며, 예를 들면 대조군과 대비하여 예를 들면 약 5% 이상, 약 10% 이상, 약 20% 이상, 약 30% 이상, 약 40% 이상, 약 50% 이상, 약 60% 이상, 약 70% 이상, 약 80% 이상, 약 90% 이상, 약 100% 이상 개선된 것을 목적하는 돌연변이가 유발된 단세포 생물체로 선별할 수 있을 것이다.

[0030] 개선된 특징을 나타내는 돌연변이가 유발된 개체를 선별하는 본원의 방법에 사용되는 단세포 생물체는 자연적 또는 인위적 돌연변이가 유발되어, 유전체에 하나 이상의 돌연변이를 갖는 것으로 예측되는 다양한 단세포 생물체를 포함하는 돌연변이 라이브러리 유래일 수 있다. 또한 본원의 방법에는 한 종류의 돌연변이를 포함할 것으로 예측되는, 하나의 세포로부터 유래된 단일 콜로니 또는 각각 동일 또는 상이한 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 다수의 세포로부터 유래된 다수 콜로니 유래일 수 있다.

[0031] 본원 방법은 주광성을 이용한 신속하고 간단한 분석으로, 자연에서 발견되는 변이체, 또는 인위적으로 돌연변이가 유발된 돌연변이 라이브러리에 포함된 수 개에서 수 만개의 돌연변이 중 원하는 돌연변이가 유발된 개체의 선별에 효과적으로 사용될 수 있다. 특히 후자의 경우, 본원의 방법을 반복적으로 수행하여, 다량의 돌연변이가 유발된 단세포 생물체를 신속하고 효율적으로 선별할 수 있다.

[0032] 본원에서 사용된 용어 "광반응성"은 단세포 생물체에 광이 조사되는 경우, 주광성에 의해 광의 반대편으로 이동하는 특성을 나타내는 것으로, 이는 일정시간, 예를 들면 30분 동안, 일정한 광도, 예를 들면 $30 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 가 조사된 경우, 도입한 총 세포, 예를 들면 약 3,000개 세포 중에 주광성에 의해 반대편으로 도달한 세포 수의 수로 측정될 수 있다.

[0033] 본원에서 사용된 용어 광민감성은 단세포 생물체에 광이 조사되는 경우, 주광성에 의해 광의 반대편으로 얼마나 신속하게 이동하는 지를 나타내는 것으로, 일정한 광도 예를 들면 $30 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 의 빛이 조사된 경우, 일정거리, 예를 들면 3 cm를 주광성에 의해 도달하는데 걸리는 시간으로 측정될 수 있다.

[0034] 본원에서 사용된 주광성 반응 지표또는 주광성 지표는 광에 반응한 단일세포 생물체의 특징 변화를 나타낼 수 있는 지표로 다양한 수치를 포함할 수 있으며, 상기 주광성 반응 지표는, 예를 들면 본 방법에 사용된 총 단세포 생물체 수에 대한 주광성에 반응하여 단위 시간당 이동한 단세포 생물체 수의 비; 단위 시간 당 이동한 단세포 생물체 수의 분포를 기초로 한 히스토그램 정점 분석; 또는 상기 방법에 사용된 단세포 생물체의 단위 거리당 이동에 소요된 평균 시간, 또는 속도 또는 그 편차를 포함하는 것이다. 예를 들면 본원의 실시예 및 도 3 내지 9에 기재된 다양한 방식으로 산출될 수 있다. 예를 들면 도 5의 정점 분석을 통해 야생형 균주와 돌연변이 균주의 반응 도달시간의 정점 이동을 관찰할 수 있으며, 정점 분석을 통해 세포의 최대 반응 시간과 반응한 세포의 비율 분석 등이 가능하다.

[0035] 본원에 따른 일 구현예에서, 본 방법이 후술하는 본원에 따른 장치에 사용되는 경우는 예를 들면 상기 방법에 사용된 총 세포 수 대비 상기 채널을 통해 일정 시간 동안 상기 도달부로 이동한 총 세포 수의 비; 일정한 수의 세포가 상기 도달부로 이동하는데 소요된 평균 시간 또는 그 편차; 상기 방법에 사용된 세포의 상기 도달부까지 이동속도; 및 상기 방법에 사용된 세포가 상기 도달부까지 이동하는데 걸리는 시간에 따른 세포 수 분포를 포함하나, 이로 제한하는 것은 아니다.

[0036] 본원의 방법에 사용될 수 있는 단세포 생물체는 앞서 언급한 바와 같으며, 예를 들면 주광성 및 운동성을 나타내는 광합성 단세포 생물체, 예를 들면 미세조류가 사용된다. 한 구현예에서, 미세조류는 녹조류, 규조류, 홍조류, 편모류, 담록조류, 갈색 편모조류, 황녹색조류, 와편모류, 또는 남조류인, 예를 들면 녹조류 (*Chlorella*, *Dunaliella*, *Scenedesmus*, *Haematococcus*, *Nannochloris* 등), 규조류 (*Skeletonema*, *Thalassiosira*,

Phaeodactylum, *Chaetoceros* 등), 홍조류 (*Porphyridium cruentum*, *Galdieria* 등), 편모류 (*Isochrysis*, *Pavlova* 등), 담록조류 (*Tetraselmis*, *Pyramimonas*), 갈색 편모조류 (*Chlamydomonas*, *Rhodomonas*, *Chroomonas* 등), 황녹색조류 (*Olistodiscus* 등), 와편모류 (*Cryptothecodinium*, *Alexandrium*, *Gymnodinium*, *Chattonella*, *Karenia* 등), 남조류 (*Spirulina*, *Synechococcus*, *Synechocystis*, *Cyanidium* 등)를 들 수 있으나, 이로 제한하는 것은 아니다. 일 구현예에서는 갈색 편모조류, 특히 *Chlamydomonas spp.*, *Rhodomonas spp.*, *Chroomonas spp.*, 더욱 특히 클라미도모나스 레인하르티아이(*Chlamydomonas reinhardtii*)가 사용되나, 이로 제한하는 것은 아니다.

[0037] 본원 방법에서 단세포 생물체를 지속적 광조건에서 배양한 후, 상기 단세포 생물체를 암조건에서 배양하는 전처리 단계를 추가로 포함할 수 있다. 전처리 단계는 지속적인 광조건에서 배양함으로써 세포의 활성이 가장 우수한 대수기 상태로 유지하기 위한 것이고, 주광성 측정 직전에 암조건에서 배양하는 것은 빛에 대한 민감성을 증가시켜 주광성에 의한 세포의 광반응성을 증가시키기 위함이다.

[0038] 즉 전처리 단계는 지속적 광조건은 광합성을 통해 성장하는 미세조류가 활동성이 가장 우수한 대수기 상태로 될 수 있는 광량이면 충분한 것이며, 특별히 한정되는 것은 아니다. 또한 대수기에 보다 신속한 도달을 위해 광이 지속적으로 조사될 수 있다. 이러한 조건을 만족하는 한 광량 및 조사 시간은 한정되지 않으나, 예를 들면 지속적 광조건은 예를 들면 약 $40 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 세기의 광을 일정시간 예를 들면 약 12 내지 24시간 동안 조사하는 것이나, 이로 제한하는 것은 아니다.

[0039] 상기 목적을 달성하는 한 다양한 범위의 광도 및 시간이 사용될 수 있다. 사용되는 파장은 실험 대상 단세포 생물체의 구체적 종류에 따라 상이할 수 있다. 광합성이 가능한 단세포 생물체 별로, 효율적으로 인지하는 빛의 파장이 있으며, 당업자라면 이러한 사항을 고려하여 적절한 파장을 선택할 수 있을 것이다. 예를 들면 미세조류 클라미도모나스의 경우 안점(eyespot) 이라고 하는 빛을 감지하는 부분이 있는데, 이 부분이 인지하는 광 파장이 일반적으로 540 ~ 570 nm 또는 430 ~ 500 nm 파장의 빛을 인지하기 때문에 이 파장 영역대의 빛을 사용하는 것이 바람직하다.

[0040] 또한 전처리 단계의 배양은 세포 성장 주기의 최적의 상태인 대수증식기(exponential phase) 까지 배양한 후 다음 단계에서 사용된다. 단세포 생물체의 생장은 크게 유도기 (lag phase: induction phase); 대수증식기 (exponential phase, log phase, growth phase); 정지기 (stationary phase); 및 사멸기 (death phase)로 구성되며, 당업자라면 대수증식기를 판별할 수 있을 것이다.

[0041] 본원의 방법에 따른 주광성은 양성 및 음성 주광성을 모두 포함하는 것이다. 주광성에 관하여는 앞서 설명한 바와 같으며, 본원에 따른 일 구현예에서는 음성 주광성을 유발된다. 통상적인 빛의 강도에서는 양성 주광성을 유발하는 단세포 생물체에서 음성 주광성을 유발하기 위해서 강한 강도의 빛이 조사되어야 한다. 즉 음성 주광성을 유발할 수 있는 빛의 강도는 목적하는 대상 생물체에 따라 달라질 수 있으며, 이러한 효과를 달성할 수 있는 다양한 광도의 빛이 사용될 수 있으며, 당업자라면 주광성 정도를 기준으로 적절한 범위의 강도를 선택할 수 있을 것이다. 본원에 따른 일 구현예에서는 미세조류, 특히 클라미도모나스 레인하르티아이(*Chlamydomonas reinhardtii*)가 사용되며, 이 경우, 빛의 강도는 약 $30 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{cm}^{-1}$ 일 수 있으나, 이로 제한하는 것은 아니다. 빛의 파장과 관련되서는 앞서 언급한 바와 같다.

[0042] 본원의 방법에 따라 선별된 단세포 생물체는 대조군, 즉 돌연변이가 유발되지 않은 균주, 또는 참조로 사용하는 비교대상 균주와 비교하여, 광반응성 및 광민감성이 증가된 것으로, 이러한 특징의 변화는 상술한 주광성 지표로 측정될 수 있으며, 주광성 지표가 개선된 것을 목적하는 돌연변이가 유발된 균주로 선별할 수 있다. 주광성 지표의 개선 정도는 분석대상 또는 지표의 종류에 따라 달라질 수 있으며, 예를 들면 대조군과 비교하여 약 5% 이상, 약 10% 이상, 약 20% 이상, 약 30% 이상, 약 40% 이상, 약 50% 이상, 약 60% 이상, 약 70% 이상, 약 80% 이상, 약 90% 이상, 약 100% 이상 개선된 것을 목적하는 돌연변이가 유발된 단세포 생물체로 선별할 수 있을 것이다.

[0043] 본원의 방법은 돌연변이 균주를 제작하는 목적에 따라 추가의 단계를 포함할 수 있다. 예를 들면 돌연변이의 선별이 광합성 특징의 개질, 지질 생산의 개질, 성장속도 개선을 위한 것이라면, 각각의 특징 분석을 위한 추가의 단계를 포함한다. 예를 들면 광합성 지표, 예를 들면 광합성 색소를 포함하는 광합성 기구의 변화, 광합성 효율, 광전환 효율을 포괄적으로 추가하여 분석하는 단계를 포함할 수 있으나, 이로 제한하는 것은 아니다. 이러한 분석 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 당업자라면 적절한 것을 선택할 수 있으며, 예를 들면 본원의 실시예 및 도

3 내지 9 에 기재된 다양한 지표 예를 들면 NPQ(non-photochemical quenching), 또는 qP (Photochemical quenching) 및/또는 클로로필 a/b 비 등을 포함하나, 이로 제한하는 것은 아니다.

[0044] 다른 측면에서 본원은 또한 본원의 방법을 통해 선별된 균주에 관한 것으로, 이러한 균주는 돌연변이의 양태에 맞추어 다양한 분야에서 유용물질의 생산 등을 위해 응용될 수 있다. 예를들어 클라미도모나스 레인하르티아이 (*Chlamydomonas reinhardtii*)는 현재까지 미세조류 중 가장 많은 연구가 진행된 종으로 다른 균주에 비해 형질 전환 등의 유전자 조작이 용이하고 관련 도구들이 개발되어 있을 뿐만 아니라 유전체 서열도 밝혀져 있어 미세 조류의 모델 생물체로 여겨지고 있다. 따라서 광합성 기작이 개선된 돌연변이 균주를 선별하여, 이를 바이오디젤 생산을 위한 지질관련 연구, 수소생산 연구 등에 활용할 수 있다.

[0045] 본원 방법에 따라 선별된 균주는 실시예 및 도 7 내지 9에 기재된 바와 같이 클로로필 a/b 비율과 광합성 효율 측정 지표인 NPQ와 qP가 상관관계를 분석을 통해, 목적하는 돌연변이가 유발되었으며, 이는 본 방법의 우수성을 나타내는 것이다.

[0046]

[0047] 또 다른 측면에서 본원은 상술한 본원의 방법에 사용될 수 있는 장치에 관한 것이다. 하지만 본원의 방법은 본원의 방법을 달성하는 한 다양한 장치에 사용될 수 있음은 당업자에게 자명한 것이다. 즉 본원의 장치는 물론, 본원의 장치의 각 구성과 상응하는 부위를 갖는 이러한 목적을 달성할 수 있는 다른 장치가 사용될 수 있다. 이하 본원의 장치에 포함된 구성 및 그에 따른 명칭을 예로 들어 설명하나, 이에 한정되는 것은 아니며, 발명을 이해하고 해석함에 있어서는 상응하는 구성으로 해석되어야 한다.

[0048] 따라서 한 양태에서 본원은 광투과성 개체 예를 들면 단세포 생물체 유입부; 상기 개체 유입부와 별개로 형성되는 개체 도달부; 상기 개체 유입부 및 상기 개체 도달부에 유체 소통가능하게 연결된 채널부; 및 상기 채널부의 양 말단 사이에 형성된 계측부를 포함하는, 미세유체 광반응 장치에 관한 것이다.

[0049] 도 2a 및 2b를 참조하면, 본원의 장치는 일정한 간격을 두고 형성된 개체 유입부 (110) 및 개체 도달부 (120)를 포함하며, 그 사이에 다양한 모양의 채널 (130)이 위치한다. 상기 개체 유입부 (110) 및 개체 도달부 (120)는 분석 대상인 단세포 생물체를 들어갈 수 있는 공간, 모양 및 크기로 형성될 수 있으며, 대상 개체 예를 들면 단세포 생물체의 크기, 특성 및 사용되는 개체 수에 따라 다양한 모양, 크기 및/또는 재질로 형성될 수 있다. 주광성에 관한 반응을 보기위해 한 구현예에서는 광투과성 물질로 제작된다. 모양, 크기는 특정 형상으로 제한되는 것은 아니며, 동일 또는 상이하게 형성될 수 있다.

[0050] 상기 채널은 개체 유입부 및 개체 도달부와 유체가 소통될 수 있도록 형성된다. 상기 채널을 통해 개체 유입부에 단세포 생물체와 함께 도입된 배양액 및 단세포 생물체가 이동을 한다. 따라서 상기 채널은 단세포 생물체의 이동이 방해되지 않도록 저항성이 최소화 할 수 있는 구조 및 크기로 제작된다. 일 구현예에서는 상기 채널은 상기 개체 유입부 또는 도달부의 직경과 같거나 작게 형성된다. 다른 구현예에서는 도 2b에 기재된 것과 같은 크기를 가질 수 있으나, 이는 예시적인 것으로 이에 한정되는 것은 아니다.

[0051] 상기 채널의 양 말단 사이의 일부에 계측부 (140)가 형성된다. 도 10을 참조하면 상기 계측부는 이동하는 단세포 생물체를 단일 세포 수준에서 현미경적 방법을 이용하여 관찰하는 부위로, 단세포 생물체의 운동의 개별적 관찰이 가능한 구조 및 크기로 형성된다. 예를 들면 본 장치에 사용하고자하는 세포의 직경을 기준으로 예를 들면 1 개 내지 약 5 개의 세포가 통과할 수 있는 정도의 크기로 제작될 수 있으며, 사용되는 대상 단세포 생물체의 구체적 크기에 따라 달라질 수 있을 것이다. 예를 들면 약 10 μ m 내지 200 μ m, 예를 들면 특히 미세조류 클라미도모나스가 사용되는 경우, 직경은 약 50 μ m 내지 100 μ m 일 수 있으나, 이로 제한하는 것은 아니다.

[0052] 본원의 미세유체 광반응 장치에 포함되는 각 구성은 광투과성이 있는 투명한 재질로 사용되는 단세포 생물체에 대한 독성이 없고 다공성으로 생물활성에 필요한 물질전달이 용이하며, 단세포 생물체의 이동을 방해하지 않는 재질, 또는 상기 특징을 갖도록 전처리된 재질로 제작되는 것이 바람직하다. 이러한 물질로는 예를 들면 PMMA(Poly(methyl methacrylate)), PS(Polystyrene), 또는 PDMS (polydimethylsiloxane) 등을 들 수 있으나 이로 제한하는 것은 아니다.

[0053] 도 1을 참조하면 본원의 미세유체 광반응 장치는 광원을 추가로 포함할 수 있다. 본원 장치에 사용되는 단세포 생물체에 목적하는 최적의 주광성을 유발할 수 있는 광원 및 파장이 선택되며, 이러한 효과를 나타내는 한, 분

석하는 대상 및 목적에 맞추어 다양한 광원 및 파장의 빛이 사용될 수 있다.

[0054] 광원의 종류로는 일정한 파장을 방출할 수 있는 것이면 가능하며, 예를 들면 레이저 다이오드, 또는 LED (Light Emitting Diode)가 사용될 수 있다. 본원의 일 구현예에서는 분석 대상으로 미세조류가 사용되며, 특히 클라미도모나스 레인하르티아이(*Chlamydomonas reinhardtii*)의 경우, 초록과 청색 파장을 내는 LED 광원이 이용된다.

[0055] 도 1은 본원의 장치 및 이를 이용한 돌연변이 단세포 생물체 즉 균주 선별 방법을 예시적으로 나타낸 모식도이다. 본원에 따른 미세유체 광반응 장치는 주광성을 나타내는 운동성이 있는 단세포 생물체의 주광성을 이용하여 빛에 반응하는 특징이 변이된 생물체의 선별에 사용될 수 있다. 예를 들면 본원에 따른 장치의 세포 유입부에 일정량의 주광성 및 운동성을 갖는 단일 또는 다수 콜로니 유래의 단일 세포 생물체 예를 들면 미세조류를 도입한 후, 특정 강도의 강한 광을 조사하면, 이에 반응하여 세포가 광원이 조사되는 방향으로부터 멀어지는 방향으로 채널을 통해 이동한다. 채널을 통해 이동하는 세포는 계측부를 통과할 때 현미경적 관찰을 통해, 주광성 지표 산정을 위한 각종 데이터 예를 들면 일정 거리 이동 시간, 이동 세포 수 등 다양한 데이터가 수집되며, 이와 관련해서는 앞서 설명한 기재를 참조할 수 있다. 본원에 따른 일 구현예에서, 주광성을 이용한 돌연변이가 유발된 단세포 생물체로서, 미세조류가 사용되는 경우 다음의 단계를 포함할 수 있다.

[0056] 예를 들면 일 구현예에서, 본원의 장치를 이용한 방법은 예를 들면 (a) 단세포 생물체를 지속적 광조건에 배양한 후, 상기 단세포 생물체를 암조건에서 배양하는 전처리 단계; (b) 상기 전처리된 단세포 생물체를 상기 광반응 장치의 세포 유입부에 도입하는 단계; (c) 세포 유입부에 도입된 상기 단세포 생물체의 주광성을 유발할 수 있도록, 상기 세포 유입부에 광원을 조사하는 단계; (d) 상기 주광성에 의해 상기 채널을 통해 상기 도달부로 이동하는 상기 단세포 생물체를 상기 계측부에서 관찰하여, 주광성 반응 지표를 수집하는 단계; 및 (e) 대조군과 비교하여, 상기 주광성 지표가 변화된 경우, 이를 돌연변이가 유발된 세포로 선별하는 단계를 포함할 수 있으나, 이로 제한하는 것은 아니다. 상기 전처리 단계는 선택적으로 포함할 수 있다. 본 방법에 사용되는 각 용어 및 설명은 앞서 본원 방법과 관련되서 언급한 것을 참조할 수 있다.

[0057] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위해서 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐 본 발명이 하기의 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0058] <실시예>

[0059] 실시예 1 돌연변이가 유발된 균주의 제조

[0060] 본 실시예에 사용된 균주는 한양대학교 진연선 교수님 연구실에서 입수한 것으로 종은 *Chlamydomonas reinhardtii*, 야생형 (wild type) 균주 JL428로 이 야생형 균주에 삽입돌연변이 유발법 (insertional mutation)으로 무작위 돌연변이를 유발한 후 통상적으로 알려져 있는 클로로필 a/b 비율이 높은 균주가 광합성 효율이 높을 가능성이 크다는 점(Anastasiadis Melis (2012) Vol.158 930-945)을 통해, 1 차적으로 클로로필 a/b 비율이 야생형 균주보다 높은 균주들을 선별하여 본원 방법의 효능 검증을 위해 사용하였다.

[0061] 미세조류 배양에 사용된 배지는 TAP 배지이고, 이들의 구성성분은 [표 1]에 나타내었다.

표 1

TAP 배지	
성분	함량 (1L water)
TAP salts (1L water)	25 ml
NH ₄ Cl 15.0 g	
MgSO ₄ · 7H ₂ O 4.0 g	
CaCl ₂ · 2H ₂ O 2.0 g	
Phosphate solution (100 ml water)	0.375 ml
K ₂ HPO ₄ 28.8 g	
KH ₂ PO ₄ 14.4 g	
Huttners trace elements	1.0 ml

EDTA disodium salt 50 g (250 ml water)	
ZnSO ₄ · 7H ₂ O 22 g (100 ml water)	
H ₃ BO ₃ 11.4 g (200 ml water)	
MnCl ₂ · 4H ₂ O 5.06 g (50 ml water))	
CoCl ₂ · 6H ₂ O 1.61 g (50 ml water)	
CuSO ₄ · 5H ₂ O 1.57 g (50 ml water)	
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O 1.10 g (50 ml water)	
FeSO ₄ · 7H ₂ O 4.99 g (50 ml water)	
Tris base	2.42 g
Glacial acetic acid	1.0 ml

[0063] 실시예 2 미세조류 배양 및 미세유체 장치 제작

[0064] 미세유체 장치는 실리콘 기판에 음성감광제 SU-8 50을 회전도포한 후, 디자인된 마스크를 덮고 자외선노광기를 이용하여 자외선에 노출시켜 포토리소그래피 (photo-lithography)를 통해 제작되었으며, 고분자 PDMS (Polydimethylsiloxane)와 경화제를 10:1의 비율로 혼합하여 포토리소그래피로 제작된 SU-8 몰드위에 제작하였다. 완성된 PDMS 미세유체 장치는 플라즈마 처리를 통해 슬라이드 글라스와 결합시켰다. 제작된 장치는 도 2b와 같다.

[0065] 상기 장치는 도 2a에서 보는 바와 같이, 최적의 채널 구조를 선별하기 위하여, 채널의 폭 및 형태에 따른 세포 운동성을 하기 실시예 3과 같이 분석하였다. 요약하면, 초록색 LED 광원 (540 nm)을 세포를 넣어준 입구 세포 유입부 부분에 비추면서 일정 거리에 위치하는 반대쪽 부위 즉 세포 도달부에 도달하는 세포 수를 각각의 장치에서 측정하였고, 그 결과를 비교한 결과, 도 3b에 보는 바와 같이 미세유체 장치 내 세포 유입부와 근접한 채널의 폭에 의해 세포의 주광성에 따른 운동이 영향을 받는 현상을 확인하였다. 따라서 세포의 운동에 대한 저항성을 최소화하면서, 계측부에서의 개별 세포의 관찰 및 통계적 분석을 용이하게 하기위해 도 2b와 같이 채널 입구 폭이 4 mm에서 출구 폭이 100 μ m로 일정하게 줄어드는 형태의 채널이 포함된 장치 디자인을 선정하여, 상술한 바와 같이 제작하였다.

[0066] 실시예 3 빛의 파장에 따른 미세조류의 광반응 분석.

[0067] 빛에 대한 세포의 광반응성 및 광민감성을 효율적으로 일정하게 조절하기 위한 적응하기 위한 전처리 과정으로, 인위적 돌연변이가 유발되지 않은 *Chlamydomonas reinhardtii* 야생형 균주 (JL428) 및 실시예 1의 돌연변이 균주를 TAP agar 배지에서 종배양 (seed culture)하였다. 구체적으로 TAP 액체배지에 40 μ mol photon m⁻² s⁻¹ 세기의 24시간 지속적인 광조건 및 23℃ 온도조건에서 2일간 배양하였다. 2일간 배양한 후, 대수성장 단계에 접어들면, 7.5×10³ cells ml⁻¹로 희석하여 암실조건에서 1시간 동안 보관하였다.

[0068] 이후, 암실조건에서 1시간동안 보관한 세포를 하기 도 2b의 세포 유입구 부분에 40 μ l 넣고, 세포 도달부에는 40 μ l TAP 배지를 넣은 후, 계측부에서 도립 광학현미경에서 주광성에 의한 미세조류 세포의 움직임을 관찰하였다.

[0069] 빛의 파장별 미세조류의 광반응을 분석하기 위해 세포 농도와 조건을 상기 조건과 같이 일정하게 유지한 후, 사용하는 LED 광원의 파장을 다르게 조절하였다. 초록색 (540 nm), 적색 (650 nm), 청색 (470 nm), 백색 (전파장) 그리고 암실 조건의 총 5개의 조건에서 미세조류의 주광성을 통한 광반응 분석을 실시하였다.

[0070] 그 결과, 도 3a에서 보는 바와 같이, 미세조류는 특정 파장에서 민감한 반응을 보였는데, 초록색 (540 nm)과 파란색 (470 nm)에서 반응성이 크게 나타났고, 빨간색 (650 nm)에서는 빛에 대한 반응을 나타내지 않았다. 이를 통해, 본 발명에서 기본적으로 사용되는 빛의 파장은 540 nm의 초록색 LED 광원을 사용하였다.

[0071] 실시예 4 야생형 및 돌연변이 균주의 주광성에 의한 광반응 패턴 분석 및 선별

[0072] 초록색 LED 광원 (540 nm)을 $30 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 의 세기로 세포 유입부에 빛을 비추주고, 계측부에 도달하는 세포 수를 30분간 분단위로 측정하였다. 결과는 도 5에서 보는 바와 같이, 광반응에 의한 각 균주별 시간에 따른 이동 개체수를 분석한 결과 일정한 형태의 히스토그램을 얻었다. 돌연변이 균주들의 히스토그램을 대조군의 히스토그램과 비교한 결과, 돌연변이 1, 2, 3의 경우 대조군에 비해 광반응 히스토그램의 정점이 왼쪽으로 이동한 것을 확인하였다. 반면 돌연변이 4, 5의 경우 대조군과 큰 차이를 보이지 않았다. 이 결과는 광합성 효율과 간접적으로 관련되는 클로로필 a/b 비율과 관련하여, 일반적으로 클로로필 a/b 비율이 높은 균주가 광합성 효율이 높은 균주일 확률이 높는데, 주광성에 의해 얻은 히스토그램을 분석해보면, 대조군에 비하여 클로로필 a/b 비율이 증가된 균주가 광에 의해 이동하는 세포수가 증가하였고, 대조군과 클로로필 a/b 비율이 큰 차이를 보이지 않는 돌연변이 균주는 주광성에 의한 이동 세포수가 차이가 거의 없는 것으로 보아, 도 5의 히스토그램의 패턴 분석만으로도 광합성 효율이 증가된 돌연변이가 유발된 균주를 주광성 반응으로 쉽고 효율적인 관측이 가능하다는 것을 알 수 있다.

[0073] 또한, 도 6a에서 보는 바와 같이, 전체 세포 수 대비 광반응으로 이동한 개체 수의 비율로부터 대조군 균주와 돌연변이 균주들의 광반응성을 비교한 결과 대조군 균주의 경우 전체 세포의 65%가 광반응을 보인 것에 비해 돌연변이 1은 85%가 광반응을 보여 이동하였으며 돌연변이 2, 3도 80% 가량의 세포가 광반응을 보였다. 반면 돌연변이 4, 5는 광반응 비율에 있어서도 대조군과 유사한 비율을 보였다. 이 결과는 클로로필 a/b 비율의 증가로 인한 광합성 효율이 증가된 돌연변이 균주는 동일 광세기에 대하여 반응하는 정도가 대조군에 비해 더 크다는 것을 의미하고, 대조군에 비하여 클로로필 a/b 비율의 증가가 크지 않은 돌연변이 균주는 광합성 효율의 정도가 대조군과 비슷함을 의미하고, 이러한 균주는 동일 광세기에 대한 광반응성 역시 대조군과 비슷하다는 것을 의미한다.

[0074] 대조군과 돌연변이 균주의 빛에 대한 주광성에 의해 일정시간 내 세포 개체의 이동에 걸리는 평균시간의 편차를 분석함으로써, 빛에 대한 민감성을 비교 분석할 수 있으며 이를 통해 간단히 광반응이 특이적인 균주를 선별하는 것이 가능하다. 돌연변이 1, 2, 3의 경우 도 6b에서 보는 바와 같이 대조군에 비해 평균시간이 감소한 것을 확인할 수 있었으며, 돌연변이 4, 5는 대조군에 비해 크게 감소하지 않는 결과를 보였다. 이 결과는 클로로필 a/b 비율이 증가함으로써 광합성 효율이 증가된 돌연변이 균주는 일정 광세기에 대하여 대조군 균주보다 민감함을 의미하며, 이는 세포의 이동 속도와 관련되어 나타난다. 동일한 광세기에 대하여 광에 대한 민감성이 증가된 균주는 더 빠른 반응으로 이동하여 일정거리 (3cm)를 가는데 걸리는 소요시간이 줄어드는 것을 나타낸다. 상대적으로 대조군 균주와 클로로필 a/b 비율이 차이가 거의 없는 균주의 경우에는 일정 광세기에 대한 민감성이 비슷하여 일정 거리를 가는데 걸리는 시간이 대조군 균주와 비교하여 거의 차이가 없음을 나타낸다.

[0075] 한편, 도 5, 6a, 6b에서 보이는 바와 같이 미세조류 대조군 및 돌연변이 균주의 주광성에 의한 광반응성은 도 4에 나타난 클로로필 a/b의 비율과 상당히 유사한 패턴을 보였으며 이는 본 발명에서 적용한 균주의 개체별 광반응성에 대한 통계적 분석법에 의해 얻은 각종 지표 (히스토그램의 정점, 이동평균시간, 광반응 세포의 비율 등)들이 주광성에 의한 광반응성, 광민감성뿐만 아니라 돌연변이에 의해 발생하는 클로로필 등 광합성기구의 변화와도 연관성을 가질 수 있음을 나타낸다.

[0076] 따라서 본 발명에서 사용된 미세유체 시스템 내 미세조류의 주광성에 대한 분석방법을 이용하여 1차 선별된 균주를 대상으로 광합성 효율이 향상된 균주를 보다 효율적으로 탐색할 수 있다.

[0077] 실시예 5 선별된 돌연변이 균주의 광합성 지표 분석

[0078] 본 실시예에서는 상기와 같이 주광성에 의해 선별된 돌연변이 균주의 광합성 효율을 측정하였다. 지표로서 NPQ와 qP를 사용하였다. NPQ는 광합성을 위해 받은 광에너지 중 광합성으로 사용하지 못하고 소멸하는 에너지로, NPQ 값이 낮을수록 광합성 효율이 높다는 것을 의미하며, qP는 광합성을 사용되는 에너지를 의미하는 것으로 qP 값이 높을수록 광합성 효율이 높다는 것을 의미한다.

[0079] 5-1 선별된 균주의 클로로필 a/b 비율과 NPQ, qP와 상관관계 분석

[0080] 선별된 균주의 클로로필 a/b 비율과 NPQ, qP와 상관관계를 다음과 같이 분석하였다. 클로로필 측정법은 흡광도 측정을 기본으로 하는 공지된 방법 (Hartumut K. Lichtenthaler와 Claus Buschmann (2001) F4.3.1-F4.3.8)을 통해 측정하였다.

[0081] 요약하면, 플라스크에서 광도 $40 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 에서 3일간 배양한 후, 대수성장기에서 접어들었을 때 클로로필 측정을 실시하였다. 플라스크를 잘 흔들어 1 ml을 1.5 ml 튜브로 옮겨 15,000 rpm에서 1분간 원심분리를 하였다. 원심분리 후 상층액을 제거하고, 메탄올 1 ml을 넣은 후 볼텍스를 수행하여 클로로필을 추출하였다. 이어 15,000 rpm에서 1분간 원심분리 한 후 상층액에 대하여 A663.2, A646.8 파장에서 흡광도를 측정하였다. 그 다음 다음 식에 대입하여 클로로필 a와 b를 측정하여 클로로필 a/b 비율을 측정하였다.

[0082] $\text{Chl a (g/ml)} = 16.72 \times A665.2 - 9.16 \times A652.4$

[0083] $\text{Chl b (g/ml)} = 34.09 \times A652.4 - 15.28 \times A665.2$

[0084] $\text{Chl a/b} = \text{Chl a} \div \text{Chl b}$

[0085] NPQ 및 qP는 TAP 배지에 아가를 포함하는 아가 배지에서 23에서 균주를 배양한 후 Imaging-PAM 클로로필 형광분석 장치(Heinz Walz GmbH, Germany)를 이용하여 측정하였다.

[0086] 이후, 실시예 3 내지 5에서와 같은 분석을 통해 수득한 데이터 즉 평균 이동 시간, 단위 시간 동안 도달된 세포 군집의 세포 비율 등과 클로로필 a/b 비율, NPQ 그리고 qP와의 분석을 실시하였다.

[0087] 결과는 도 7a 및 7b에 기재되어 있다. 이에 나타난 바와 같이 클로로필 a/b 비율이 높을수록 NPQ 값이 낮은 상관관계를 나타내고 qP 값은 높은 상관관계를 나타내어 광합성 효율이 높음을 나타내는 것이다.

[0088] 5-2 선별된 균주의 평균 도달 시간과 NPQ와의 상관관계 분석

[0089] 실시예 4에 기재된 바와 같이 각 균주에 대해 얻은 주광성 지표 중 평균 도달 시간과 실시예 5에 기재된 광합성 효율 측정 지표와의 분석을 실시하였다.

[0090] 결과는 도 8a 및 8b에 기재되어 있다. 이에 나타난 바와 같이 두 지표 간의 상관성을 나타내는 r^2 값이 1에 가까울수록 상관성이 높다는 것으로, 종전에 사용되는, 클로로필 a/b 비율 보다는 본원 방법에 따른 주광성을 통해서 얻은 지표가 광합성 효율이 증가된 돌연변이 균주를 선별하는데 유용함을 나타내는 것이다.

[0091]

[0092] 5-3 선별된 균주의 대조군 대비 이동 세포수의 비와 NPQ와의 상관관계 분석

[0093] 실시예 4에 기재된 바와 같이 각 균주에 대해 얻은 주광성 지표 중 대조군 대비 이동 세포수의 비와 실시예 5에 기재된 광합성 효율 측정 지표와의 분석을 실시하였다.

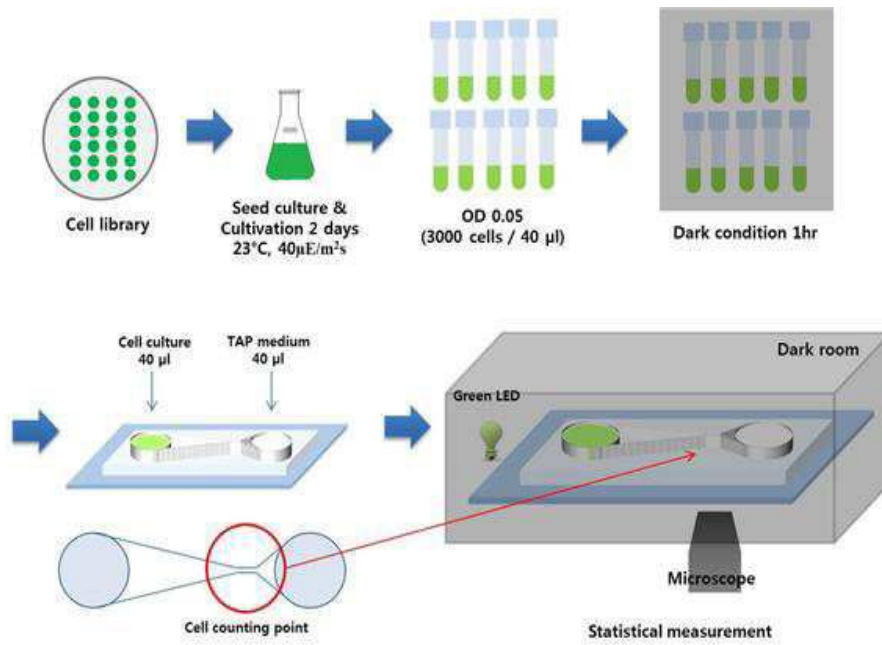
[0094] 결과는 도 9에 기재되어 있다. 이에 나타난 바와 같이 그 비율이 1 이상인 돌연변이 균주는 일정시간 동안 대조군 균주에 대비하여 더 많은 세포수가 이동한 것으로, 이는 광민감성 및 광반응성이 우수한 돌연변이 균주를 의미하고, 이러한 균주가 NPQ 값이 낮은 상관관계를 나타내므로, 이는 광합성 효율이 증가된 균주임을 나타낸다. 따라서 이러한 결과는 주광성을 이용한 본원 방법을 이용할 경우, 광합성 효율이 높은 균주의 선별이 가능함을 나타내는 것이다.

[0095] 이상에서 본원의 예시적인 실시예에 대하여 상세하게 설명하였지만 본원의 권리범위는 이에 한정되는 것은 아니고 다음의 청구범위에서 정의하고 있는 본원의 기본 개념을 이용한 당업자의 여러 변형 및 개량 형태 또한 본원의 권리범위에 속하는 것이다.

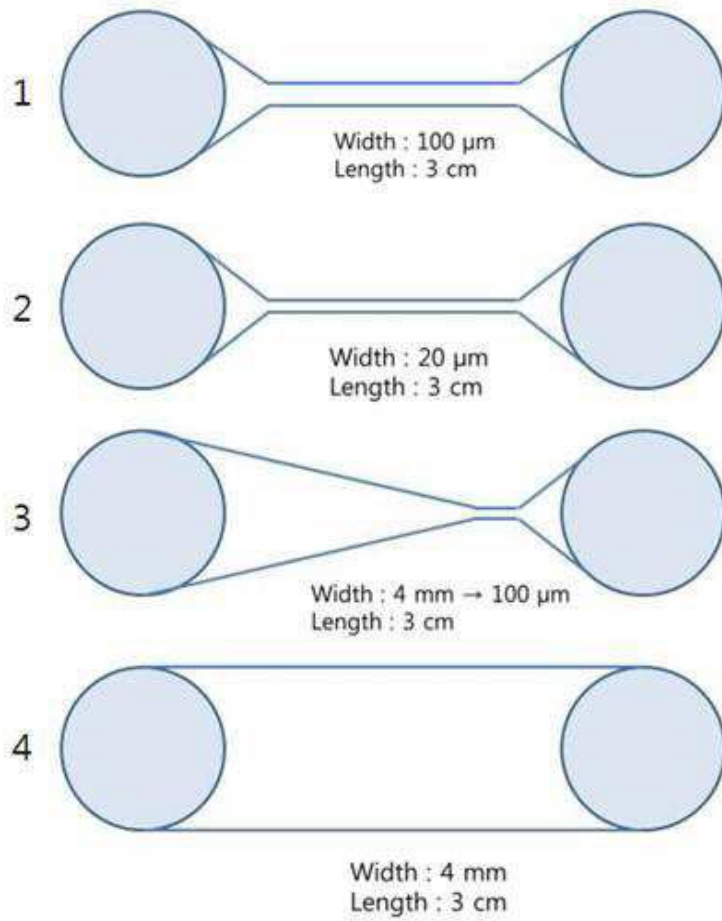
[0096] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 본 명세서에 참고문헌으로 기재되는 모든 간행물의 내용은 본 발명에 도입된다.

도면

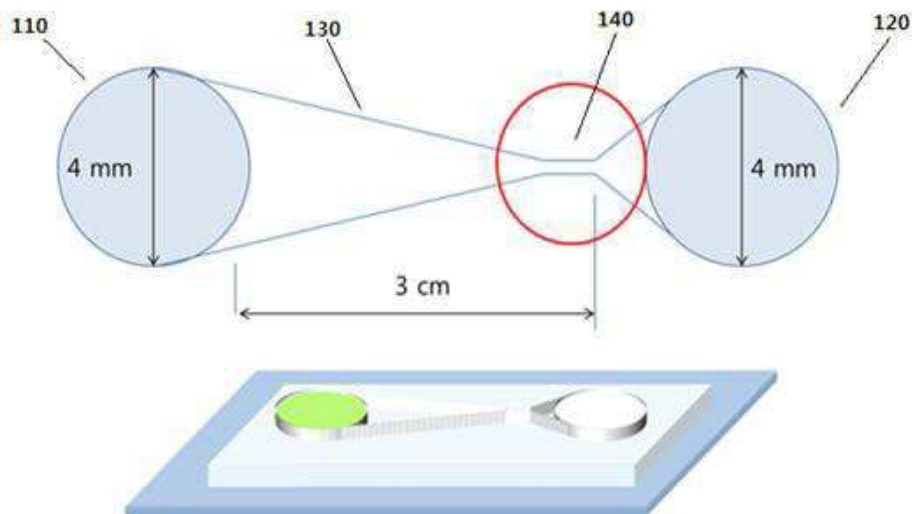
도면1



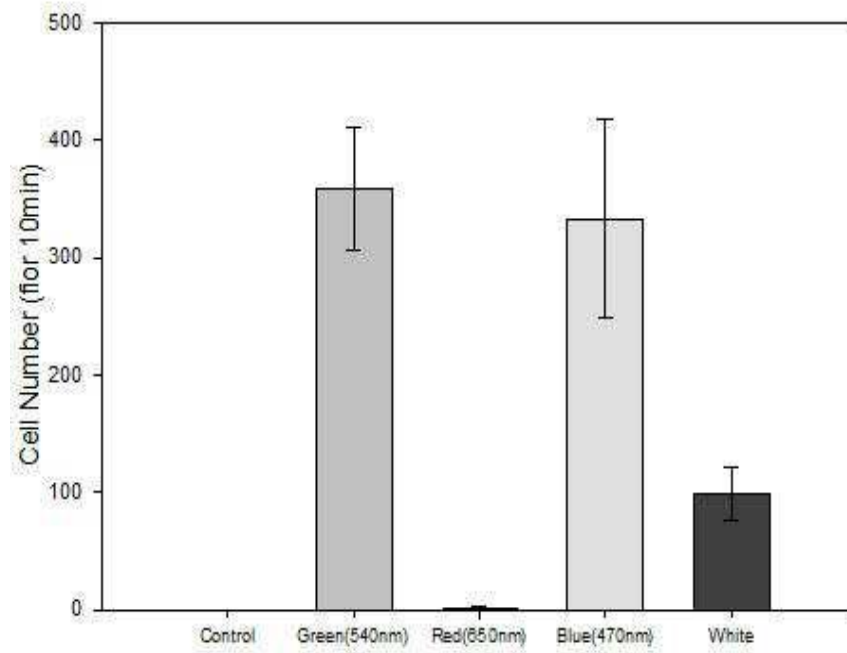
도면2a



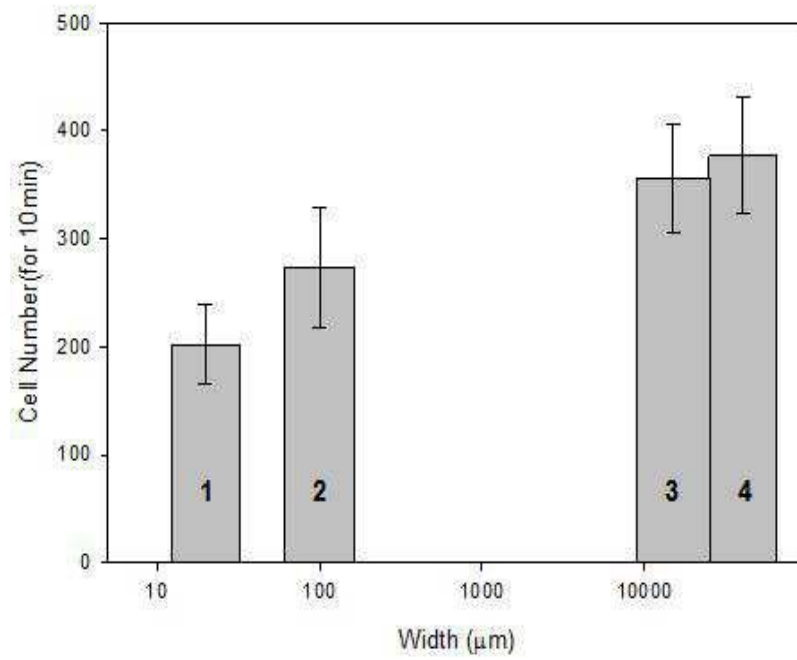
도면2b



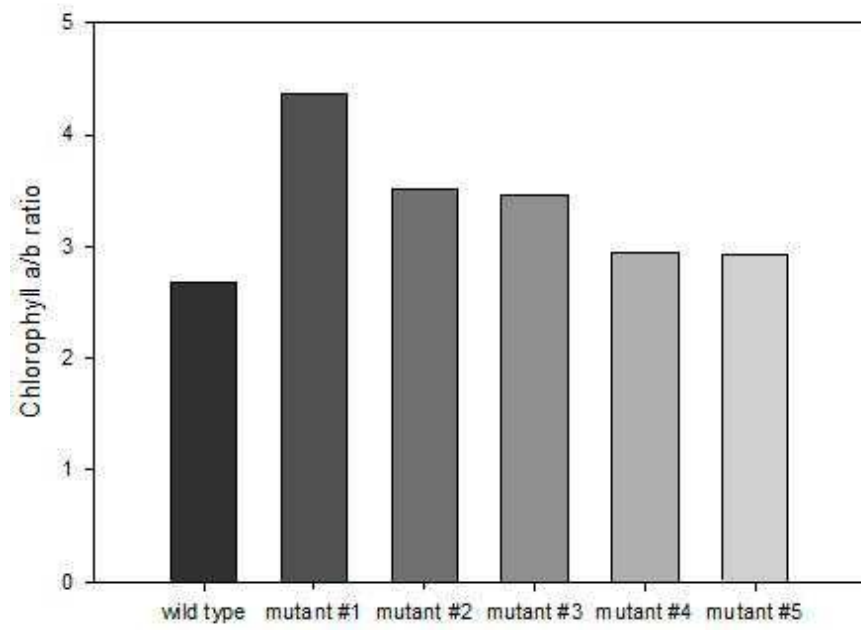
도면3a



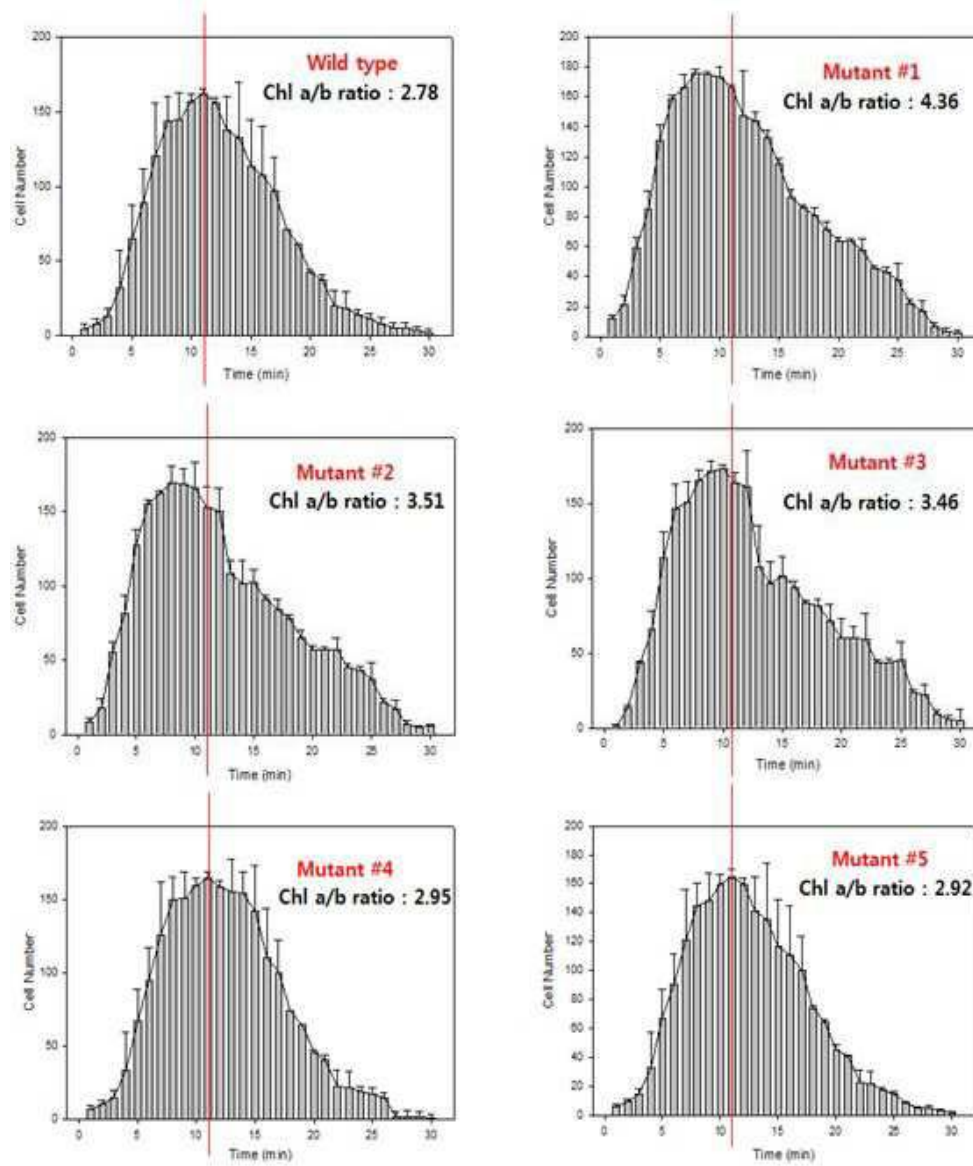
도면3b



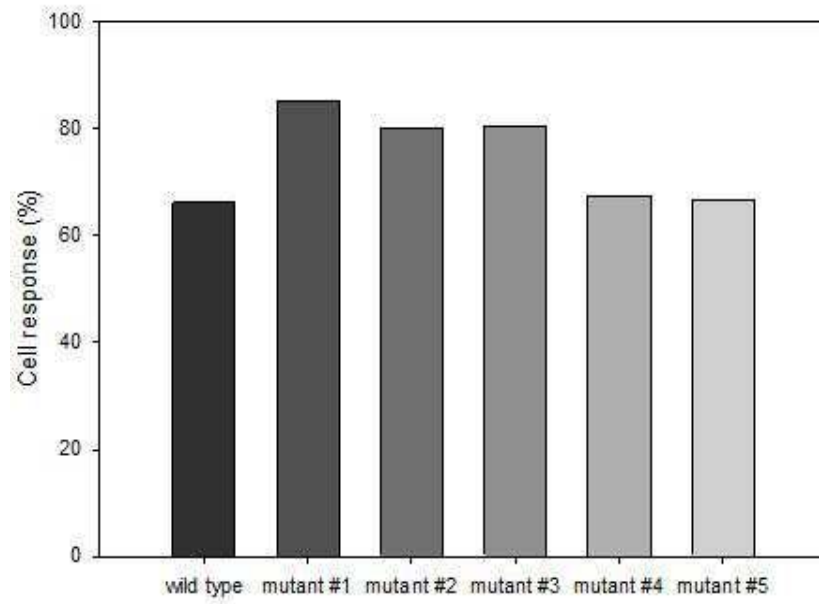
도면4



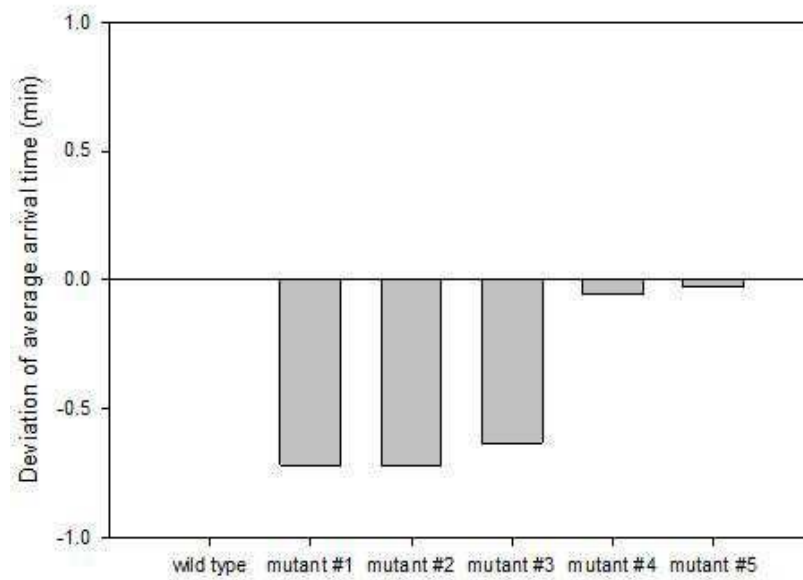
도면5



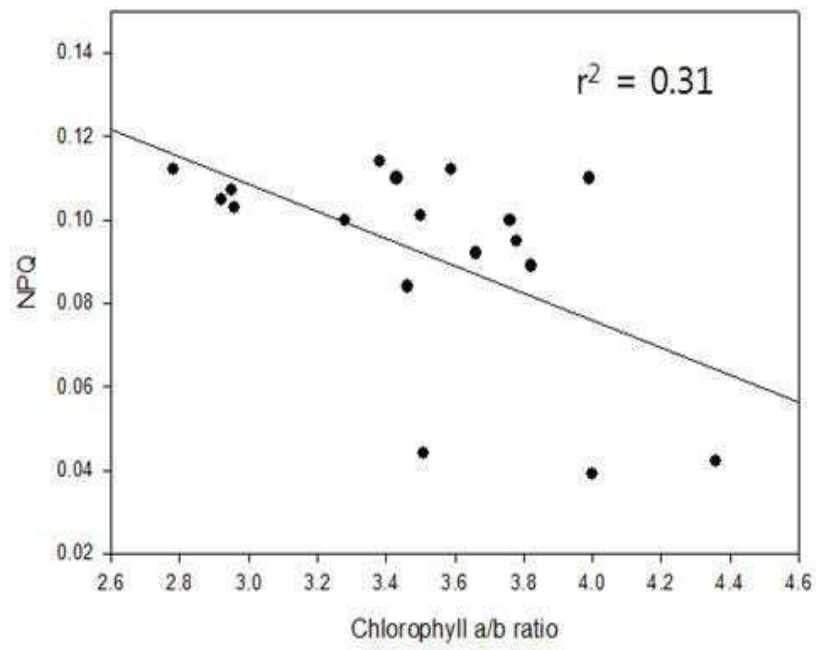
도면6a



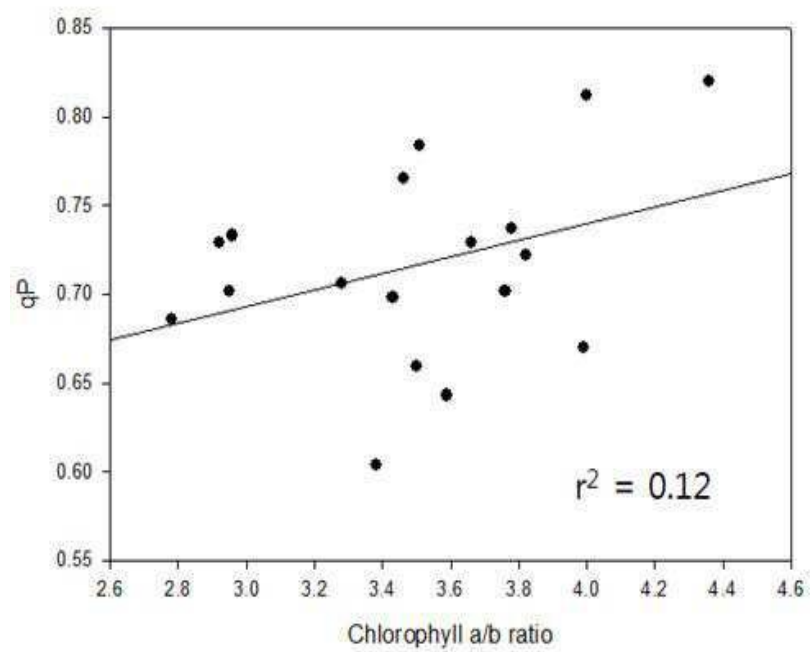
도면6b



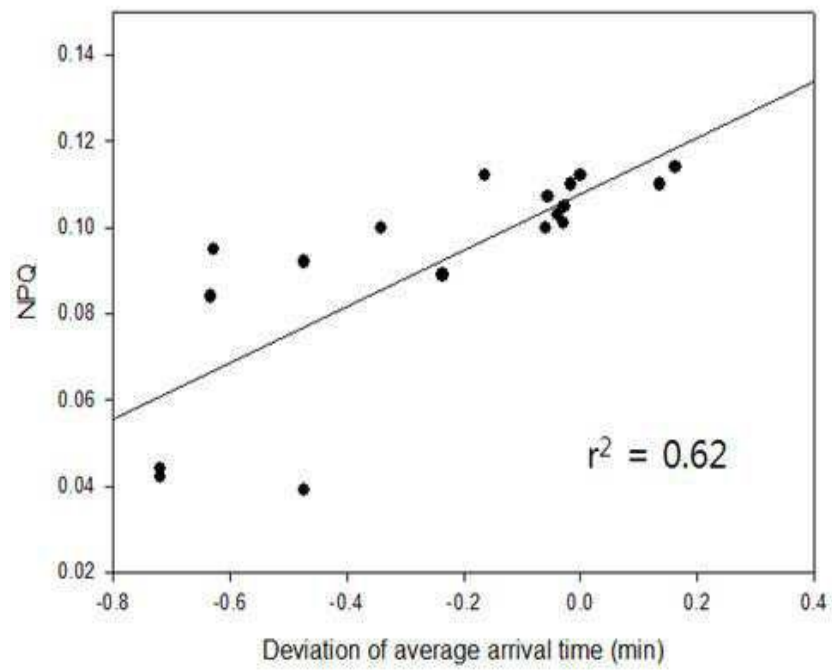
도면7a



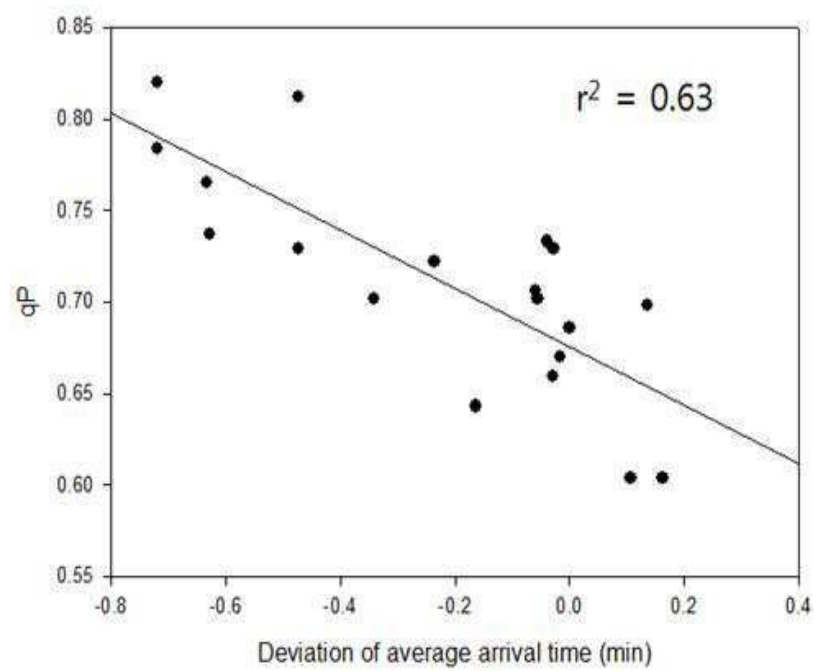
도면7b



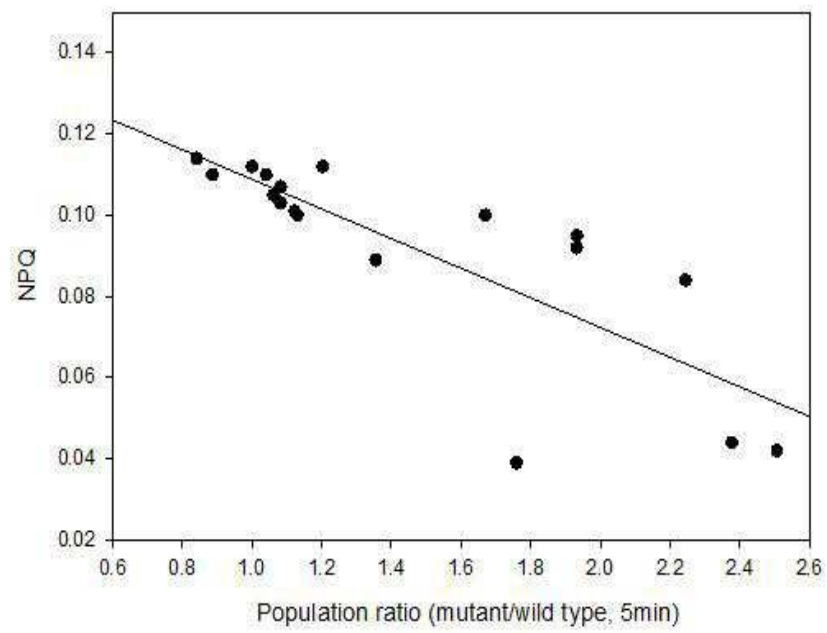
도면8a



도면8b



도면9



도면10

