



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0056832
(43) 공개일자 2016년05월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12M 1/24 (2006.01) B01L 3/00 (2006.01)
C12Q 1/04 (2006.01) G01N 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12M 1/24 (2013.01)
B01L 3/5027 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0158370
(22) 출원일자 2015년11월11일
심사청구일자 2015년11월11일
(30) 우선권주장
1020140157444 2014년11월12일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
심상준
서울특별시 강남구 선릉로 221, 301동 803호 (도곡동, 도곡렉슬아파트)
성영준
서울특별시 성북구 안암로 145 고려대학교 자연캠퍼스 창의관 618호 (안암동5가)
김영환
서울특별시 성북구 안암로 145 고려대학교 자연캠퍼스 창의관 618호 (안암동5가)
(74) 대리인
특허법인충현

전체 청구항 수 : 총 13 항

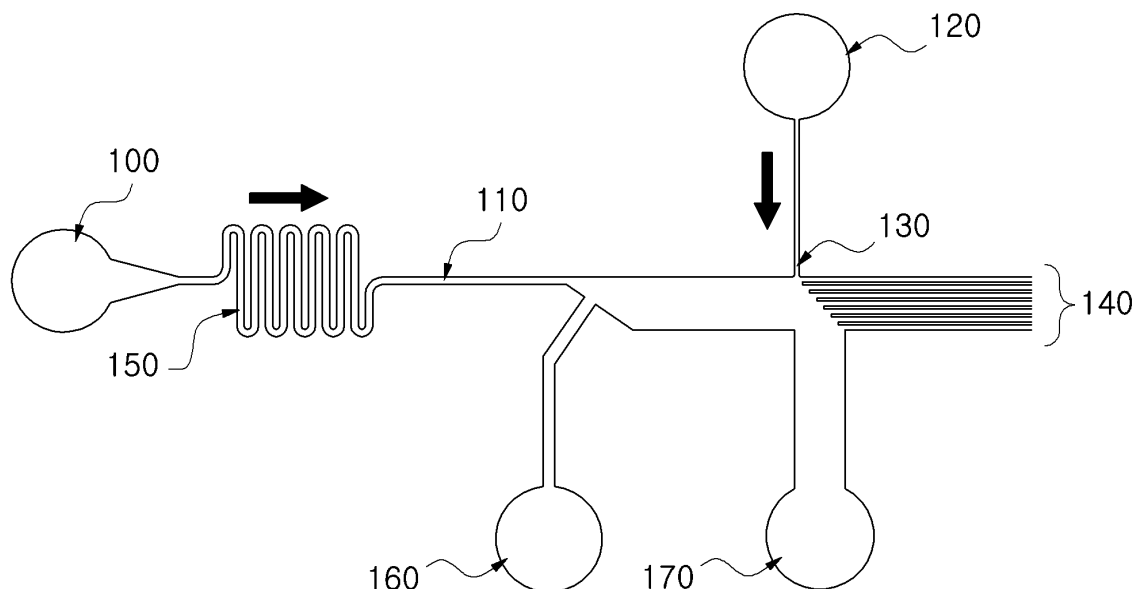
(54) 발명의 명칭 미세조류 균주의 선별방법 및 미세조류 균주 선별용 마이크로 장치

(57) 요약

본 발명은 미세조류 균주의 선별방법 및 미세조류 균주 선별용 마이크로 장치에 관한 것이다.

본 발명에 따른 미세조류 균주의 선별방법 및 미세조류 균주 선별용 마이크로 장치는 성장성 및 광합성 능력이 우수한 미세조류 균주를 선별하는 것이 가능하다. 특히 상기 미세조류는 현미경으로 관찰이 가능할 정도로 크기가 작기 때문에 종래의 기술로는 성장성 및 광합성 능력이 우수한 미세조류의 균주를 선별하는 것이 어려웠는데, 본 발명에 따르면 미세액적의 밀도차를 이용하여 성장성이나 광합성 능력이 우수한 미세조류 균주를 효과적으로 선별하는 것이 가능하다.

대표도 - 도8



(52) CPC특허분류

B01L 3/502784 (2013.01)

C12Q 1/04 (2013.01)

G01N 35/08 (2013.01)

B01L 2300/0883 (2013.01)

G01N 2035/00158 (2013.01)

G01N 2035/00237 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014M1A8A1049278

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 (재)한국이산화탄소포집및처리연구개발센터

연구사업명 거대과학연구개발사업(Korea CCS 2020사업)

연구과제명 생물학적 이산화탄소 고속전환 유기 자원화 기술

기 여 율 1/4

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2015.06.01 ~ 2016.05.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 G031423013

부처명 산업통상자원부

연구관리전문기관 한국산업기술평가관리원

연구사업명 에너지기술개발사업

연구과제명 미세조류를 이용한 이산화탄소의 고부가가치 상품전환 공정의 실증

기 여 율 1/4

주관기관 한국지역난방공사

연구기간 2015.06.01 ~ 2016.05.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013R1A2A1A01015644

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중견연구자지원사업

연구과제명 생물공정의 실시간 고속 모니터링을 위한 나노 플라즈몬 검지 플랫폼 기술 개발

기 여 율 1/4

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2015.06.01 ~ 2016.05.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20100027955

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 선도연구센터지원사업

연구과제명 진단/치료용 고분자 소재 연구센터

기 여 율 1/4

주관기관 성균관대학교 산학협력단

연구기간 2014.09.01 ~ 2015.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

- 1) 연속상의 유체 내에 존재하며, 분산상의 유체 내에 형성된 단일 또는 복수개의 미세액적 내부에서 미세조류 균주를 배양하는 단계;
 - 2) 상기 연속상 및 분산상의 유체 흐름을 따라 상기 미세액적을 이동시키면서, 상기 연속상 및 분산상의 유체 흐름과 수직인 방향으로 또 다른 유체를 공급하여 이동하는 미세액적에 외력을 가하는 단계; 및
 - 3) 상기 수직인 방향으로 공급된 유체로 인해 미세액적 내부에 발생하는 밀도차로부터 미세조류 균주를 선별하는 단계;
- 를 포함하는 미세조류 균주의 선별방법.

청구항 2

제1항에 있어서,
상기 미세액적은 평균 직경이 30-150 μm 인 것을 특징으로 하는 미세조류 균주의 선별방법.

청구항 3

제1항에 있어서,
상기 1)단계에서 공급되는 연속상의 유체는 200-600 mbar 의 유체 압력으로 공급되는 것을 특징으로 하며, 상기 분산상의 유체는 100-300 mbar 의 유체 압력으로 공급되는 것을 특징으로 하는 미세조류 균주의 선별방법.

청구항 4

제1항에 있어서,
상기 2)단계에서 수직 방향으로 공급되는 유체는 50-400 mbar 의 유체 압력으로 공급되는 것을 특징으로 하는 미세조류 균주의 선별방법.

청구항 5

제1항에 있어서,
상기 3)단계에 따른 미세조류 균주의 선별은 수직인 방향으로 공급된 유체로 인해 90-180 ° 의 각을 형성하면서 이동한 미세액적을 분리하여 선별하는 것을 특징으로 하는 미세조류 균주의 선별방법.

청구항 6

미세액적 유출부, 미세액적 이동채널, 수직 방향 유체 배출구, 수직 방향 유체 관통부 및 미세액적 분리부가 연결되며,
상기 미세액적 유출부에 주입되는 미세액적은 배양된 미세조류 균주를 포함하여 분산상의 유체로부터 형성되고,
상기 미세액적 유출부에서 상기 미세액적 및 연속상의 유체가 미세액적 이동채널로 이동한 후, 상기 수직 방향

유체 배출구로부터 배출된 또 다른 유체가 상기 수직 방향 유체 관통부에서 미세액적에 연속 상의 유체 흐름과 수직 방향의 힘을 가하는 것을 특징으로 하며,

상기 수직 방향으로 주입된 또 유체로 인해 상기 미세액적이 굴절되어 미세액적 분리부에 밀도차에 따라 분리되는 것을 특징으로 하는 미세조류 균주 선별용 마이크로 장치.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 수직 방향 유체 관통부에 공급된 유체로 인해 90-180 ° 의 각을 형성하면서 이동한 미세액적을 미세액적 분리부에서 분리하여 선별하는 것을 특징으로 하는 미세조류 균주 선별용 마이크로 장치.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 미세액적은 평균 직경이 30-150 μm 인 것을 특징으로 하는 미세조류 균주 선별용 마이크로 장치.

청구항 9

제6항에 있어서,

상기 연속상의 유체는 200-600 mbar 의 유체 압력으로 공급되는 것을 특징으로 하며, 상기 미세액적을 형성한 분산상의 유체는 100-300 mbar 의 유체 압력으로 공급되는 것을 특징으로 하는 미세조류 균주 선별용 마이크로 장치.

청구항 10

제6항에 있어서,

상기 수직 방향 유체 배출부로부터 배출되어 수직 방향 유체 관통부로 공급되는 유체는 50-400 mbar 의 유체 압력으로 공급되는 것을 특징으로 하는 미세조류 균주 선별용 마이크로 장치.

청구항 11

제6항에 있어서,

상기 미세액적 유출부는 750-2000 μm 의 직경으로 이루어진 저장조를 포함하는 미세조류 균주 선별용 마이크로 장치.

청구항 12

제6항에 있어서,

상기 미세액적 유출부와 미세액적 이동채널 사이에는 지그재그 형태의 미세액적 이동 대기부를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 미세조류 균주 선별용 마이크로 장치.

청구항 13

제6항에 있어서,

상기 마이크로 장치는 유체 추가 투입구 또는 수직 방향 유체 순환부를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 미세조류 균주 선별용 마이크로 장치.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 미세조류 균주의 선별방법 및 미세조류 균주 선별용 마이크로 장치에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 미세조류는 식물플랑크톤(Phytoplankton)이라고 한다. 원래 뿌리, 줄기, 잎이 체계적으로 분화되지 않은 하등식물 중에서 엽록소를 광합성을 하는 식물을 조류라고 하며, 조류는 다시 단단한 구조물에 부착하여 서식하는 미역, 다시마와 같은 해조류와 육안으로 볼 수 없어 현미경을 통해서만 볼 수 있으며 물속에서 자유로이 부유하며 살아가는 생물인 미세조류로 나뉘어진다. 이러한 미세조류는 크기가 50 μm 이하의 단세포 조류이다. 또한 미세조류는 자연계의 먹이사슬에서 최하위에 위치하기 때문에 광합성을 통해 유기물을 생산하는 독립영양생물이다.

[0003] 이러한 미세조류를 보다 구체적으로 살펴보면, 상기 미세조류는 광합성이 가능한 원핵 또는 진핵 미세유기체로서 그들의 단세포적이거나 단순한 다세포적인 구조로 인해 혹독한 환경에서도 빠르게 성장이 가능하다. 또한 미세조류는 태양에너지를 화학에너지로 바꾸는 광합성을 이용해서 그들 스스로 번식하고 수 일 안에 전체의 성장 주기를 완성한다. 이러한 과정 중에 태양에너지를 이용하여 이산화탄소 및 무기물을 후에 바이오디젤로 전환이 가능한 다량의 중성지질로 축적할 수 있는 능력을 갖고 있기 때문에 화석연료 사용으로 급증하는 에너지자원 고갈문제 및 온실가스 배출문제를 해결할 수 있는 대안으로 주목 받고 있다.

[0004] 이러한 미세조류를 바이오디젤 생산에 사용하는 것은 다른 바이오매스에 비해 여러 이점을 갖는다. 먼저, 실용적인 관점에서, 미세조류는 배양이 간편하다. 더욱이, 미세조류는 특정한 영양분이나 충분한 공기 주입을 통해 성장 속도를 증가시킬 수 있을 뿐만 아니라 태양빛과 간단한 영양분이 공급되는 단순한 환경에서도 쉽게 성장할 수 있다. 특정 미세조류 종들은 다양한 환경적 조건에서 살 수 있도록 적응할 수 있다. 따라서, 현재 바이오디젤의 공급 원료로 사용되는 대두, 해바라기 그리고 야자수의 성장이 불가능한 특정 환경에서도 성장이 가능한 미세조류 종들을 발굴하는 것이 가능하다. 뿐만 아니라, 미세조류는 현재 보편적인 바이오디젤 공급원료들에 비해 성장 속도 및 생산성이 뛰어나고 더 적은 재배 면적이 필요하다. 미세조류를 활용한 바이오디젤은 황을 포함하지 않기 때문에 미세먼지, 일산화탄소, 탄화수소 그리고 황산화물의 배출을 억제하면서 석유에서 얻어낸 디젤만큼의 효과를 발휘할 수 있다. 그리고 미세조류의 생고정 능력을 이용하면 바이오디젤을 생산하면서 배출되는 온실가스 및 이산화탄소의 양을 줄일 수 있다. 미세조류는 폐수에 포함된 오염 물질을 영양분으로 활용할 수 있기 때문에 폐수처리에도 큰 도움이 된다. 또한, 바이오디젤 추출 후 결과물로 남은 미세조류 바이오매스는 에탄올, 메탄, 가축의 원료 및 유기 비료로 사용될 수 있다. 이처럼 미세조류는 상업적으로 널리 사용되는 고부가가치 생물학적 부산물을 얻을 수 있기 때문에 생물공학분야에서 그 잠재적 가치가 매우 클 것으로 기대된다.

[0005] 이와 같이 잠재적 활용성이 높은 미세조류이지만 상업적으로 이를 활용하기 위해서는 현재 미세조류의 야생종에 비해 좀 더 성장성이 좋고 지질 축적량이 많은 균주가 필요하다. 하지만 미세조류는 대장균 같은 미생물과 달리 일반적인 유전자조작 방법으로는 균주 개량에 어려움이 있다. 따라서 현재는 임의로 유전자를 삽입해 다양한 균주들을 얻고 이를 실제 배양시키면서 원하는 목적에 맞는 균주들을 선별하는 방법으로 우수한 미세조류 균주를 획득하고 있다. 하지만 일반적인 균주 선별 방법은 시간이 오래 걸리고 노동집약적이며 비용이 많이 들기 때문에 이를 해소하기 위한 다양한 연구가 진행되어오고 있다.

[0006] 마이크로 시스템에 쓰이는 고분자물질인 PDMS(Polydimethylsiloxane)는 생물체에 대한 독성이 없고 다공성으로 생물활성에 필요한 물질전달이 용이한 장점을 가지고 있다. PDMS를 이용한 마이크로 시스템은 분석하고자 하는 대상과 목적에 적합한 환경을 위한 맞춤형설계가 가능하다. 특히 높은 투명도 및 미세구조를 기반으로 광학현미경을 통한 개별 세포에 대한 지속적이고 자세한 모니터링 및 효율적인 고속선별을 가능하게 함으로써 성장성과 광합성 효율이 우수한 균주를 선별하는데 큰 기여를 할 수 있다.

[0007] 또한 마이크로 시스템은 내부에 미세조류 균주를 배양하는 공간인 미세액적을 포함하는 장치가 개발되었으며, 이러한 미세액적은 화학 및 생물학 연구에서 다양한 기회들을 제공할 수 있다. 피코리터 단위의 극도로 작은 부

피를 갖는 하나의 미세액적 내부에는 단일 세포, 단일 입자 그리고 다양한 화학물질들이 포함될 수 있기 때문에 각각의 미세액적은 개별적인 반응기로 활용될 수 있다. 따라서 미세액적 내부에서 동시에 화학적, 생물학적 반응들의 개별적인 관찰이 용이하고 수~수백 Hz의 속도로 미세액적들을 생성하는 것이 가능하기 때문에 고속처리가 필요한 실험에도 매우 적합하다. 또한, 마이크로 장치의 설계에 따라 미세액적에 다양한 기계적, 전기적 그리고 자기적 자극을 가할 수 있고 이에 따라 단일 세포 및 입자들의 반응을 관찰하기에도 용이하다. 그리고 미세액적은 그 부피 및 무게가 매우 작기 때문에 관성보다 표면장력이 더 지배적이고 작은 부피를 갖는 미세액적은 일반적인 환경에 비해서 열 및 물질 전달률이 매우 크기 때문에 개별 세포의 빠른 성장 및 화학물질들의 빠른 반응 속도를 유발할 수 있다.

[0008] 한편, 상기 검토한 바와 같이 미세조류는 상업적으로 잠재적 가치가 크기 때문에, 성장성 및 광합성 능력이 우수한 미세조류 균주를 선별해 상업적으로 활용하는 것이 중요함에도 불구하고, 이러한 균주를 선별하기 위한 노력은 많이 부족한 실정이다. 뿐만 아니라 상기 미세액적을 활용하여 성장성 및 광합성 능력이 우수한 미세조류 균주를 선별하기 위한 연구는 크게 부족한 실정이다.

[0009] 본 발명과 관련된 선행기술문헌으로는 대한민국 공개특허 제10-2014-0106933호(특허문헌 1)가 개시되어 있는데, 상기 특허문헌 1에서는 메쉬-그리드가 도입된 미세액적 마이크로웰 어레이를 이용하여 목적 유용 효소 활성의 탐색 방법 등이 개시되어 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) 특허문헌 1. 대한민국 공개특허 제10-2014-0106933호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명은 상술한 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로서, 본 발명의 목적은 성장성 및 광합성 능력이 우수한 미세조류 균주를 효과적으로 선별하는 방법이나 장치를 제공하는 것이 목적이다.

과제의 해결 수단

[0012] 위와 같은 과제를 해결하기 위한 본 발명의 한 특징에 따른 미세조류 균주의 선별방법은

[0013] 1) 연속상의 유체 내에 존재하며, 분산상의 유체 내에 형성된 단일 또는 복수개의 미세액적 내부에서 미세조류 균주를 배양하는 단계;

[0014] 2) 상기 연속상 및 분산상의 유체 흐름을 따라 상기 미세액적을 이동시키면서, 상기 연속상 및 분산상의 유체 흐름과 수직인 방향으로 또 다른 유체를 공급하여 이동하는 미세액적에 외력을 가하는 단계; 및

[0015] 3) 상기 수직인 방향으로 공급된 유체로 인해 미세액적 내부에 발생하는 밀도차로부터 미세조류 균주를 선별하는 단계;

[0016] 를 포함한다.

[0017] 본 발명의 또 다른 특징에 따른 미세조류 균주 선별용 마이크로 장치는

[0018] 미세액적 유출부, 미세액적 이동채널, 수직 방향 유체 배출구, 수직 방향 유체 관통부 및 미세액적 분리부가 순차적으로 연결되며,

[0019] 상기 미세액적 유출부에 주입되는 미세액적은 배양된 미세조류 균주를 포함하여 분산상의 유체로부터 형성되고,

[0020] 상기 미세액적 유출부에서 상기 미세액적 및 연속상의 유체가 미세액적 이동채널로 이동한 후, 상기 수직 방향

유체 배출구로부터 배출된 또 다른 유체가 상기 수직 방향 유체 관통부에서 미세액적에 연속 상의 유체 흐름과 수직 방향의 힘을 가하는 것을 특징으로 하며,

[0021] 상기 수직 방향으로 주입된 또 유체로 인해 상기 미세액적이 굴절되어 미세액적 분리부에 밀도차에 따라 분리되는 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

[0022] 본 발명에 따른 미세조류 균주의 선별방법 및 미세조류 균주 선별용 마이크로 장치는 성장성 및 광합성 능력이 우수한 미세조류 균주를 선별하는 것이 가능하다. 특히 상기 미세조류는 현미경으로 관찰이 가능할 정도로 크기가 작기 때문에 종래의 기술로는 성장성 및 광합성 능력이 우수한 미세조류의 균주를 선별하는 것이 어려웠는데, 본 발명에 따르면 미세액적의 밀도차를 이용하여 성장성이나 광합성 능력이 우수한 미세조류 균주를 효과적으로 선별하는 것이 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 광합성 미세조류 균주들을 단일세포 단위로 미세액적 안에 가두기 위해 기름성분과 광합성 미세조류 균주 세포가 담겨있는 수용액을 마이크로 관에 흘려주는 마이크로 장치도이다.

도 2는 상기 도면 1에서 미세액적 내부에 세포가 갇히는 모습을 보여주는 사진이다.

도 3은 세포 농도에 따라 미세액적에 갇힌 광합성 미세조류 세포 수에 따른 미세액적의 비율을 보여주는 그래프이다.

도 4는 생성된 미세액적의 크기 분포를 보여주는 그래프이다.

도 5는 상기 도면 1의 마이크로 장치에서 만들어진 미세액적을 모으는 사진이다.

도 6은 도 5에서 모은 미세액적을 낮은 온도에서 보관해 2 주 이상 그 형태를 유지하는 방법에 대한 모식도이다.

도 7은 다양한 밀도를 갖는 미세액적을 마이크로 장치에 다시 주입할 때 미세액적이 간격을 두고 주입될 수 있도록 유도하는 방법을 보여주는 사진이다.

도 8은 수직 방향의 흐름을 주어 밀도 차이에 따라 미세액적을 분리하기 위한 마이크로 장치도이다.

도 9는 상기 도 8의 마이크로 장치를 이용해 세포가 들어있지 않은 밀도가 작은 미세액적과 세포가 가득 차 있어서 밀도가 높은 미세액적이 수직 방향 흐름에 의해 서로 다른 배출구로 빠져서 분리되는 장면을 나타내는 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 이에 본 발명자들은 성장성 및 광합성 능력이 우수한 미세조류 균주만을 선택적으로 선별하는 것이 가능한 방법을 개발하기 위하여 예의 연구 노력한 결과, 본 발명에 따른 미세조류 균주의 선별방법 및 미세조류 균주 선별용 마이크로 장치를 발견하여 본 발명을 완성하였다.

[0025] 구체적으로 본 발명에 따른 미세조류 균주의 선별방법은

[0026] 1) 연속상의 유체 내에 존재하며, 분산상의 유체 내에 형성된 단일 또는 복수개의 미세액적 내부에서 미세조류 균주를 배양하는 단계;

[0027] 2) 상기 연속상 및 분산상의 유체 흐름을 따라 상기 미세액적을 이동시키면서, 상기 연속상 및 분산상의 유체 흐름과 수직인 방향으로 또 다른 유체를 공급하여 이동하는 미세액적에 외력을 가하는 단계; 및

[0028] 3) 상기 수직인 방향으로 공급된 유체로 인해 미세액적 내부에 발생하는 밀도차로부터 미세조류 균주를 선별하는 단계;

- [0029] 를 포함한다.
- [0030] 상기 미세액적은 미세조류를 배양하여 성장 속도 등을 관찰하고, 이를 통해 성장성 및 광합성 능력이 우수한 미세조류 군주를 선별하는 것이 가능하다. 이러한 미세액적은 특별한 제한이 있는 것은 아니지만 바람직하게는 연속상의 유체에 상기 연속상의 유체와는 상이 다른 분산상의 유체를 주입하여 미세액적을 형성하게 된다. 미세조류는 크기가 대단히 작기 때문에 일반적인 관측 장비로는 미세조류 군주의 성장성이나 광합성 능력이 우수한 미세조류 군주를 정확하게 선별하는 것이 불가능하다. 하지만 상기 미세액적을 활용하는 경우에는 미세한 크기의 군주들 사이에서 성장 속도 등을 관측함으로써 그들 사이의 상대적인 성장성 등을 판단하는 것이 가능하다. 그러므로 본 발명에서는 이러한 미세액적을 활용하여 미세조류 군주들의 상대적인 성장성 및 광합성 능력을 관찰하고, 이들 중 이러한 능력이 우수한 미세조류 군주를 선별하는 것이 가능하게 된다. 특히 이러한 성장성 및 광합성 능력이 우수한 미세조류 군주를 선별하는데 있어서, 연속상 및 분산상의 유체 흐름에 따라 상기 미세액적을 이동시키면서 상기 유체 흐름과는 수직인 방향으로 또 다른 유체를 공급하고, 이렇게 수직인 방향으로 흐르는 유체로 인한 미세액적 내부의 밀도차를 이용하여 성장성 및 광합성 능력이 우수한 미세조류 군주를 선별할 수 있다.
- [0031] 즉, 수직 방향으로 유체 흐름을 가했을 때 밀도가 큰 미세액적은 수직 방향으로 밀리는 외력에 크게 영향을 받지 않게 되고, 반대로 밀도가 작은 미세액적은 수직방향으로 밀리는 힘에 크게 영향을 받게 된다. 그러므로 본 발명에서는 이렇게 상대적으로 밀도가 큰 미세액적(수직 방향으로 밀리는 외력에 크게 영향을 받지 않는 미세액적)을 선별함으로써 성장성 및 광합성 능력이 우수한 미세조류 군주를 선별하게 된다.
- [0032] 한편, 본 발명에서 ‘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. 또한 본 발명에서 ‘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. 그러므로 본 발명의 바람직한 일실시예로서 연속상 유체가 유성의 기름 용액인 경우 분산상 유체는 물 또는 수용액일 수 있으며, 연속상 유체가 물 또는 수용액인 경우 분산상 유체는 유성의 기름 용액일 수 있다.
- [0033] 한편, 본 발명은 성장성 및 광합성 효율이 좋은 미세조류의 돌연변이 군주를 미세액적을 이용하여 선별하는 것일 수 있다.
- [0034] 또한, 본 발명에서 사용된 용어인 ‘미세액적의 밀도 차이’는 미세액적 내부에서 미세조류 군주의 성장성 차이에 따라 달라지는 미세액적의 밀도 차이를 의미한다.
- [0035] 상기 미세액적은 평균 직경이 특별한 제한이 있는 것은 아니지만 바람직하게는 30-150 μm 인 것이 바람직한데, 상기 미세액적의 평균 직경이 30 μm 미만인 경우에는 미세액적의 직경이 미세조류 군주보다 작기 때문에 바람직하지 않으며, 상기 미세액적의 평균 직경이 150 μm 를 초과하는 경우에는 미세액적의 표면이 불안정하여 미세액적간 융합이 일어날 수 있어 바람직하지 않다.
- [0036] 또한 상기 상기 1)단계에서 공급되는 연속상의 유체는 200-600 mbar의 유체 압력으로 공급되는 것을 특징으로 하며, 상기 분산상의 유체는 100-300 mbar의 유체 압력으로 공급되는 것이 바람직하다. 상기 연속상의 유체와 분산상의 유체가 상기 유체 압력으로 주입되어야만 원하는 직경의 미세액적을 생성할 수 있어서 바람직하다.
- [0037] 또한 상기 2)단계에서 수직 방향으로 공급되는 유체는 50-400 mbar의 유체 압력으로 공급되는 것이 바람직한데, 상기 수직 방향으로 공급되는 유체의 유체 압력이 50 mbar 미만인 경우에는 수직 방향의 유체가 유출부를 빠져 나오지 못하여 바람직하지 않고, 상기 상기 수직 방향으로 공급되는 유체의 유체 압력이 400mbar를 초과하는 경우에는 미세액적이 분리부로 이동하는 것을 방해하여 바람직하지 않다.
- [0038] 한편, 상기 3)단계에 따른 미세조류 군주의 선별은 수직인 방향으로 공급된 유체로 인해 90-180 °의 각을 형성하면서 이동한 미세액적을 분리하여 선별하는 것이 바람직하다. 상기 미세액적이 형성한 각이 90 ° 미만인 경우에는 밀도차가 작아 미세액적 내에 배양된 미세조류 군주가 충분히 성장되지 못한 것이어서 바람직하지 않으며, 상기 미세액적이 형성하는 각은 상기 유체들의 흐름상 180 °를 초과할 수 없다. 한편, 보다 정밀한 미세조류 군주의 선별을 위해서는 더욱 바람직하게는 120-180 °의 각을 형성하면서 이동한 미세액적을 분리하여 선별하는 것일 수 있으며, 가장 바람직하게는 150-180 °의 각을 형성하면서 이동한 미세액적을 분리하여 선별하는 것일 수 있다. 이렇게 150-180 °의 각을 형성하는 경우에는 성장성 및 광합성 능력이 가장 우수한 미세조류 군주를 선별하는 것일 수 있다.

- [0039] 본 발명의 또 다른 특징에 따른 미세조류 균주 선별용 마이크로 장치는
- [0040] 미세액적 유출부(100), 미세액적 이동채널(110), 수직 방향 유체 배출구(120), 수직 방향 유체 관통부(130) 및 미세액적 분리부(140)가 연결되며,
- [0041] 상기 미세액적 유출부에 주입되는 미세액적은 배양된 미세조류 균주를 포함하여 분산상의 유체로부터 형성되고,
- [0042] 상기 미세액적 유출부에서 상기 미세액적 및 연속상의 유체가 미세액적 이동채널로 이동한 후, 상기 수직 방향 유체 배출구로부터 배출된 또 다른 유체가 상기 수직 방향 유체 관통부에서 미세액적에 연속 상의 유체 흐름과 수직 방향의 힘을 가하는 것을 특징으로 하며,
- [0043] 상기 수직 방향으로 주입된 또 유체로 인해 상기 미세액적이 굴절되어 미세액적 분리부에서 밀도차에 따라 분리되는 것을 특징으로 한다.
- [0044] 본 발명에 따른 상기 미세조류 균주 선별용 마이크로 장치는 장치 내에서 운동성을 가지지 않는 미세조류의 다양한 돌연변이 균주들에 대해 미세액적을 이용해서 성장성을 관찰하고 미세액적의 밀도 차이로부터 높은 성장성 및 광합성 효율을 보이는 균주를 선별하는 것이 가능하다.
- [0045] 한편, 본 발명은 성장성 및 광합성 효율이 좋은 미세조류의 돌연변이 균주를 본 발명에 따른 상기 미세조류 균주 선별용 마이크로 장치를 이용하여 선별하는 것일 수 있다.
- [0046] 또한 상기 미세액적은 평균 직경이 30-150 μm 인 것이 바람직하다.
- [0047] 한편, 상기 수직 방향 유체 관통부에 공급된 유체로 인해 90-180 °의 각을 형성하면서 이동한 미세액적을 미세액적 분리부에서 분리하여 선별하는 것을 특징으로 한다. 한편, 보다 정밀한 미세조류 균주의 선별을 위해서는 더욱 바람직하게는 120-180 °의 각을 형성하면서 이동한 미세액적을 분리하여 선별하는 것일 수 있으며, 가장 바람직하게는 150-180 °의 각을 형성하면서 이동한 미세액적을 분리하여 선별하는 것일 수 있다. 이렇게 150-180 °의 각을 형성하는 경우에는 성장성 및 광합성 능력이 가장 우수한 미세조류 균주를 선별하는 것일 수 있다.
- [0048] 또한 상기 연속상의 유체는 200-600 mbar의 유체 압력으로 공급되는 것을 특징으로 하며, 상기 미세액적을 형성한 분산상의 유체는 100-300 mbar의 유체 압력으로 공급되는 것이 바람직하다.
- [0049] 또한 상기 수직 방향 유체 배출부로부터 배출되어 수직 방향 유체 관통부로 공급되는 유체는 50-400 mbar의 유체 압력으로 공급되는 것이 바람직하다.
- [0050] 또한 상기 미세액적 유출부는 750-2000 μm 의 직경으로 이루어진 저장조를 포함하는 것이 바람직하다.
- [0051] 또한 상기 미세액적 유출부와 미세액적 이동채널 사이에는 지그재그 형태의 미세액적 이동 대기부(150)를 더 포함하는 것이 바람직하다. 이렇게 미세액적 이동 대기부를 더 포함하게 되면 미세액적들이 시간 차를 두고 이동하게 되어 보다 정밀한 분리가 가능하게 된다.
- [0052] 또한 상기 마이크로 장치는 유체 추가 투입구(160) 또는 수직 방향 유체 순환부(170)를 더 포함하는 것이 바람직하나, 상기 유체 추가 투입구는 미세액적 이동채널을 통과한 미세액적이 수직 방향 유체 관통부를 통과할 때까지 나란한 정렬을 유지할 수 있도록 추가 유체가 더 투입되는 부위이며, 상기 수직 방향 유체 순환부는 수직 방향으로 관통한 유체가 수직 방향 유체 관통부에 정체하여 미세액적의 이동을 방해하지 않도록 순환하는 부위이다.
- [0053] 또한 특별한 제한이 있는 것은 아니지만, 상기 미세조류 균주 선별용 마이크로 장치에 광학현미경을 장착하는 것도 가능하며, 이렇게 광학현미경을 장착하게 되면 빛에 의해 반응하는 균주를 미시적 관점에서 개별 세포 단위로 분석하는 것이 가능하게 되며, 균주 군집에 대한 통계적 분석을 용이하게 수행할 수 있는 장점이 있다.
- [0054] 또한 상기 미세조류 균주 선별용 마이크로 장치는 수직 방향으로 유체 흐름을 가했을 때 밀도가 큰 미세액적은 수직 방향의 유체 흐름에 영향을 적게 받고, 반대로 밀도가 작은 미세액적은 수직 방향의 유체 흐름에 영향을 크게 받게 된다. 그러므로 본 발명에서는 이러한 밀도가 상대적으로 큰 미세액적(수직 방향의 유체 흐름에 영향을 적게 받는 미세액적)을 선별함으로써 성장성 및 광합성 능력이 우수한 미세조류 균주를 선별하게 된다.
- [0055] 또한, 상기 미세액적 유출부에 투입되는 미세액적의 제조시 장치 내의 채널을 소수성으로 만들고 미세액적을 원

활하게 생성하기 위해 슬라이드 글라스 위에 폴리디메틸실록산(PDMS)을 얇게 코팅할 수 있다. 이때, 친수성인 PDMS를 소수성으로 만들기 위해 마이크로장치 제작 후 100-150 °C에서 10-15 분간 가열하는 것이 바람직하다. 또한, 상기 마이크로 장치는 상기 미세액적이 미세액적 이동채널로 이동하기 전에 분리된 미세액적이 출구로 쉽게 빠져나가지 못하게 미세구조물을 더 포함할 수 있고, 연속상과 분산상이 들어오는 입구부분에 먼지 및 이물 질이 채널 내부로 들어가지 못하도록 필터를 더 구비할 수도 있다.

[0056] 또한, 본 발명은 광합성 미세조류 균주를 단일 세포에서부터 다수의 세포 단위로 미세액적 내부에 포획할 수 있다.

[0057] 본원에서 사용된 용어 “미세액적의 밀도 차이”는 미세액적 내부에 포획된 광합성 미세조류 세포 수의 차이에 따라 달라지는 미세액적의 밀도 차이를 말한다.

[0058] 본 발명은 세포 농도를 달리함에 따라 단일 세포에서부터 다수의 세포 단위로 미세액적 내부에 세포를 가두는 것이 용이하다. 세포 농도가 커짐에 따라 미세액적에 갇히는 세포의 수도 많아질 것이고 이를 통해 서로 다른 밀도를 갖는 미세액적을 생성할 수 있다. 또한, 일정한 흐름으로 기름 상과 세포가 담긴 수용액 상을 마이크로 장치내에 흘려주면 균일한 크기를 갖는 미세액적을 생성하는 것이 가능하다. 이렇게 생성되는 미세액적을 활용하기 위해 실리콘 판을 통해 모아서 낮은 온도에서 유지시켜주면 2 주일 이상 미세액적을 온전하게 보관하는 것이 가능하다.

[0059] 이하 본 발명을 바람직한 실시예를 참고로 하여 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0060] 실시예

[0061] <실시예 1: 미세조류 배양 및 미세액적 기반 선별 마이크로 장치 제작>

[0062] 클로렐라 볼가리스(*Chlorella vulgaris*) 균주를 TAP agar 배지에서 종배양 (seed culture) 단계로 TAP 액체배지에 $50 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 세기의 24 시간 지속적인 광조건 및 23 °C 온도조건에서 2 일간 배양하였다. 이는 탄소원에 대한 화학적 반응성을 높이고 효율적으로 일정하게 조절하기 위한 적응 과정이다. 2 일간 배양한 후, 대수증식기(exponential phase) 단계에 접어들면, 일정 세포농도로 100 ml 플라스크에 TAP 액체배지에 $50 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 세기의 24 시간 지속적인 광조건 및 23 °C 온도조건에서 4 일간 배양하여 대수증식기(exponential phase) 단계에 접어들게 하였다.

[0063] 본 발명에 사용되는 마이크로 장치는 실리콘 기판에 음성감광제 SU-8 50을 회전 도포한 후, 디자인된 마스크를 덮고 자외선 노광기를 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 마이크로 장치는 플라즈마 처리를 통해 슬라이드 글라스와 결합시켰다. 본 실험에 사용된 배지는 TAP 배지이고, 이들의 구성성분은 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

TAP Medium	
성분	함량 (in 1L water)
TAP salts (in 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 (in 100 ml water)	0.375 ml
K ₂ HPO ₄ 28.8 g	
KH ₂ PO ₄ 14.4 g	
Hutner's 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
Acetic acid	1.0 ml

[0064]

[0065]

<실시예 2: 마이크로 장치 내에서 광합성 미세조류 세포를 포함하는 미세액적의 생성>

[0066]

이후, 유체펌프 장치를 이용하기 위해 실리콘 관 끝을 파라필름으로 감싸고 마이크로 장치의 입구와 실리콘 관을 연결하기 위해 알코올로 세척 및 질소를 이용해 먼지를 제거한 파이프팅에 사용하는 화이트 팁을 마이크로 장치 입구에 꽂아 실리콘 관과 연결한다. 그 후, 실리콘 관을 통해 한쪽 마이크로 장치 입구에는 연속상(continuous phase)로 계면활성제인 PFPE-PEG triblock copolymer와 기름 성분인 FC40를 1:50의 부피비로 섞어 40 mmHg의 압력으로 마이크로 장치에 흘려주었고 또 다른 마이크로 장치 입구에는 분산상(dispersed phase)로 TAP 배지에 일정 세포농도(1.32×10^7 cells ml⁻¹)를 희석하여 60 mmHg의 압력으로 마이크로 장치에 흘려주어 도 2에서 보이는 바와 같이 미세조류 세포가 포함된 미세액적을 생성하였다.

[0067]

<실시예 3: 세포의 농도에 따라 미세액적에 포획된 세포수의 분포>

[0068]

도 1에서의 마이크로 장치를 이용해 세포 농도를 증가시키면서 미세액적 내부에 광합성 미세조류 세포를 포획시켰다. 세포 농도가 증가함에 따라 더 많은 수의 세포가 미세 액적 내부에 포획되는 것을 관찰 할 수 있었고 이를 통해 다양한 밀도를 갖는 미세액적을 생성할 수 있었다.

[0069]

<실시예 4: 생성된 미세액적의 크기 분포 및 보관>

[0070]

도 1에서의 마이크로 장치 내부로 흘러 들어가는 기름 상과 수용액 상의 유체 흐름 속도가 일정하면 평균 106.87 마이크로미터의 직경을 갖는 미세액적이 생성된다. 약 60 여개의 미세액적에 대해서 직경의 분포도를 조사해본 결과 평균 직경에서 10 % 범위 내에서 일정한 직경을 갖는 미세액적이 생성됨을 알 수 있었다. 이렇게 생성되는 미세액적을 실리콘 관을 이용해 도 5에서처럼 한 곳에 모으는 것이 가능하다. 이렇게 모아진 미세액적을 도 6에서처럼 낮은 온도에서 보관하면 2 주 이상 온전한 형태의 미세액적을 보관할 수 있다.

[0071]

<실시예 5: 수직 방향의 유체흐름을 가해 밀도 차이에 따른 미세액적의 분리>

[0072]

밀도가 서로 다른 미세액적을 도 8의 마이크로 구조에 주입할 때 특별한 구조물이 없이 주입하면 미세액적이 뭉쳐서 주입되고 이는 효율적인 분리를 방해하게 된다. 따라서 도 1의 미세액적 생성에서 사용된 flow-focusing 구조를 사용한다면 도 7에서 보이는 바와 같이 미세액적 간에 거리를 유지하면서 새로운 마이크로 장치에 미세액적을 주입하는 것이 가능하다(도 8에 따르면 미세액적 이동 대기부에서 미세액적 이동채널로 이동하는 과정). 이렇게 간격을 두고 주입된 미세액적이 지나갈 때 그에 수직인 방향으로 또 다른 유체흐름을 가해준다. 도 9에

서 보이는 바와 같이 밀도가 높은 미세액적은 수직 방향의 유체 흐름에 의해 수직 방향으로 밀리는 힘을 적게 받아 상대적으로 위쪽 관을 따라 이동하게 될 것이고 밀도가 낮은 미세액적은 수직 방향의 유체 흐름에 대해 밀리는 힘을 크게 상대적으로 아래쪽 관을 따라 이동하게 될 것이다. 즉, 미세액적의 밀도 차이에 따라 미세액적이 서로 다른 방향으로 이동할 것이다. 도 9의 가장 위쪽 사진은 미세액적의 밀도가 작은 경우 아래쪽 관을 통해 미세액적이 이동하는 것을 보여주고 가운데 사진은 미세액적의 밀도가 커 수직 방향으로 밀리는 힘을 적게 받아 상대적으로 위쪽 관을 통해 미세액적이 이동하는 것을 보여준다. 마지막으로, 밀도가 다양한 미세액적이 섞여 있을 때, 밀도가 큰 미세액적은 위쪽으로, 밀도가 작은 미세액적은 아래쪽으로 이동하는 것을 보여주는 사진이다. 이처럼 미세액적이 흐르는 방향에 수직한 힘을 이용하면 밀도 차이에 따라 미세액적을 분리해낼 수 있다.

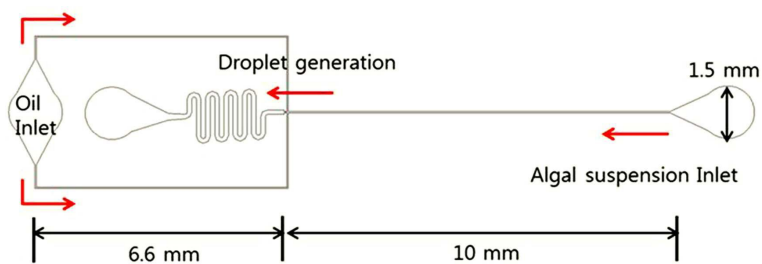
[0073] 상기에서는 본 발명의 바람직한 실시예에 대하여 설명하였지만, 본 발명은 이에 한정되는 것은 아니고, 본 발명의 기술 사상 범위 내에서 여러 가지로 변형하여 실시하는 것이 가능하고, 이 또한 첨부된 특허 청구 범위에 속하는 것은 당연하다.

부호의 설명

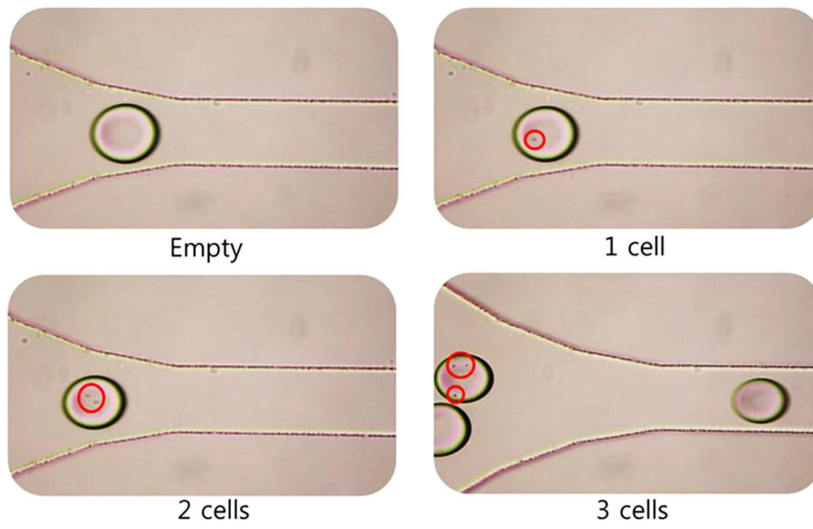
- [0074]
- 100. 미세액적 유출부
 - 110. 미세액적 이동채널
 - 120. 수직 방향 유체 배출구
 - 130. 수직 방향 유체 관통부
 - 140. 미세액적 분리부
 - 150. 미세액적 이동 대기부
 - 160. 유체 추가 투입구
 - 170. 수직 방향 유체 순환부

도면

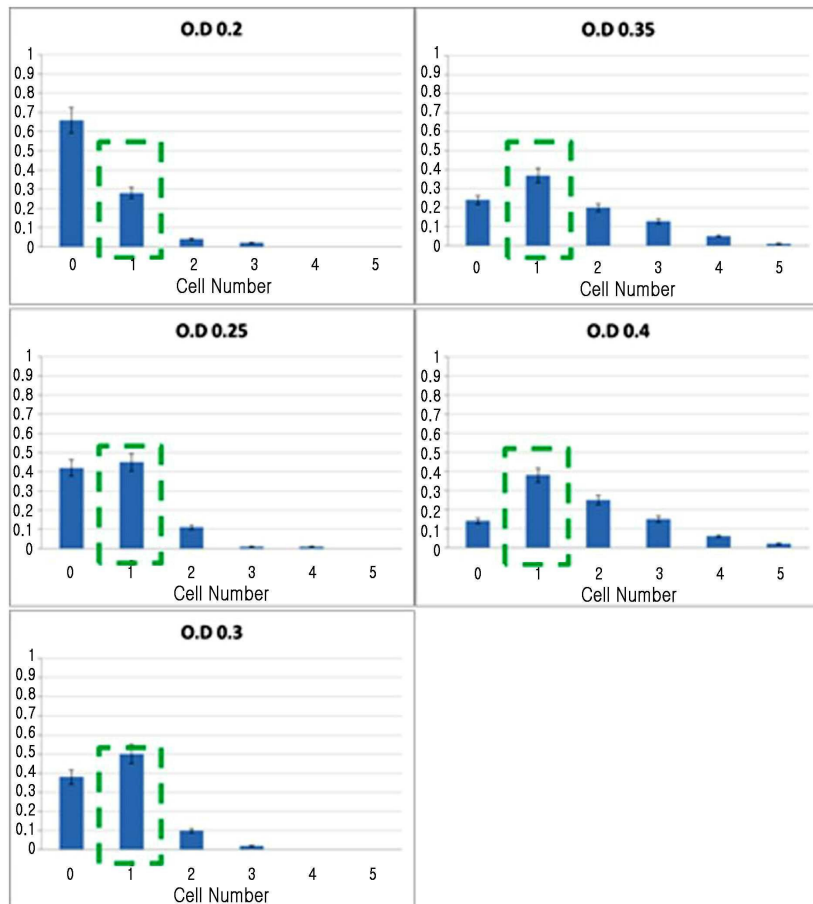
도면1



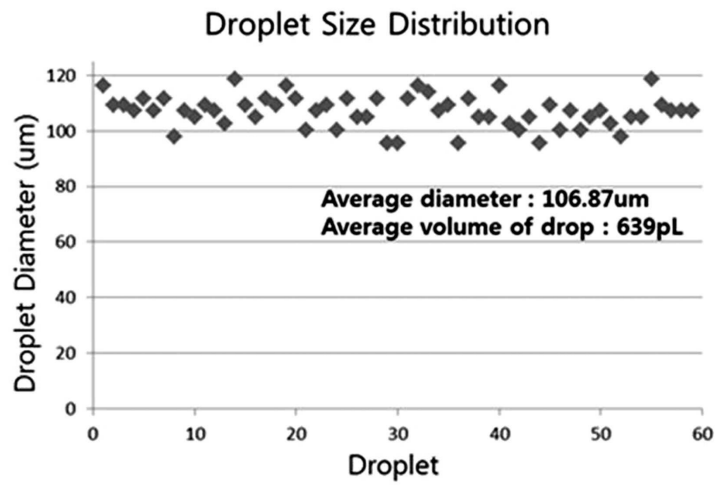
도면2



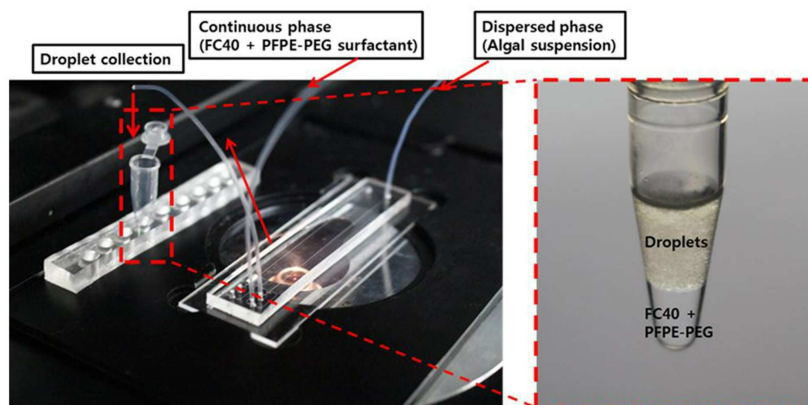
도면3



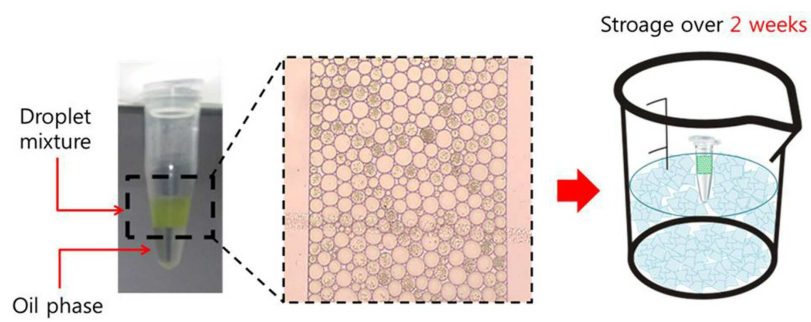
도면4



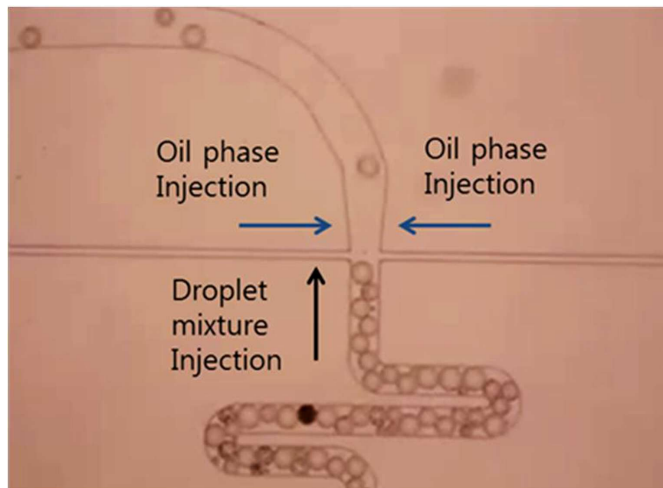
도면5



도면6

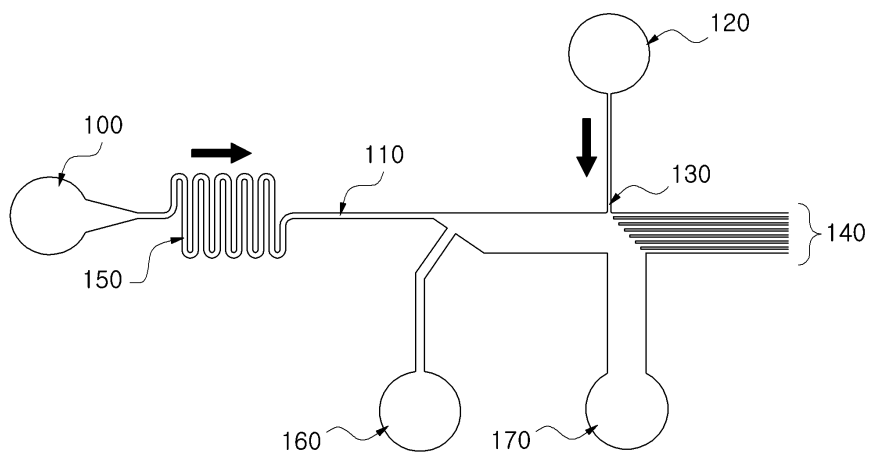


도면7



Flow-focusing geometry

도면8



도면9

