



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2014년08월01일  
 (11) 등록번호 10-1424855  
 (24) 등록일자 2014년07월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
 C12Q 1/04 (2006.01) C12N 1/12 (2006.01)  
 (21) 출원번호 10-2011-0061691  
 (22) 출원일자 2011년06월24일  
 심사청구일자 2012년06월29일  
 (65) 공개번호 10-2013-0000887  
 (43) 공개일자 2013년01월03일  
 (56) 선행기술조사문헌  
 W02009117743 A3\*  
 Journal of Lipid Research, 26권, 781-789  
 면(1985.)\*  
 \*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
 한국생명공학연구원  
 대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)  
 (72) 발명자  
 오희목  
 대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)  
 나현준  
 대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)  
 (뒷면에 계속)  
 (74) 대리인  
 특허법인이룸

전체 청구항 수 : 총 3 항

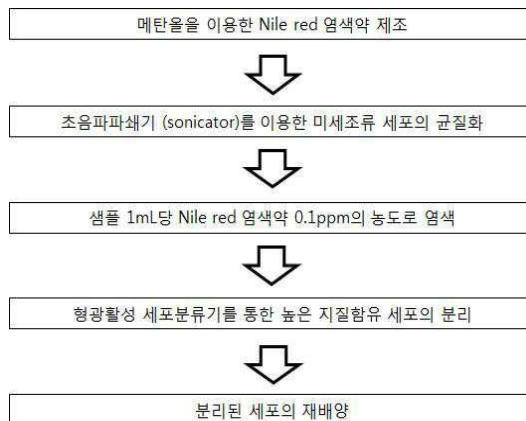
심사관 : 박정민

(54) 발명의 명칭 **형광활성 세포분류기와 나일레드 염색약을 이용한 높은 지질함량을 가지는 미세조류 균주의 분리 방법**

**(57) 요약**

본 발명은 형광활성 세포분류기 (fluorescence activated cell sorter, FACS)와 나일레드(Nile red) 염색약을 이용하여 높은 지질함량을 가지는 미세조류 균주를 신속하게 분리하는 방법 및 이를 재배양하는 방법에 관한 것으로서, 본 발명의 미세조류 균주 분리 방법에 의하면, 초음파파쇄기 (sonicator)를 이용하여 세포를 균질화 함으로써 나일레드(Nile red) 염색약의 사용 농도를 1/10 수준으로 줄이고도 균질한 염색이 가능하게 유도하였으며, 형광활성 세포분류기 (fluorescence activated cell sorter, FACS)를 이용함으로써 상대적으로 높은 지질을 함유하는 미세조류 균주를 보다 빠르고 정확하게 분리할 수 있으며, 각각 하나의 세포로 분리할 수 있는바, 이로부터 세포의 재배양이 가능하다.

**대표도 - 도1**



(72) 발명자

**이재연**

대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)

**최강국**

대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2010-0029723

부처명 교육과학기술부

연구사업명 글로벌프론티어연구개발사업

연구과제명 고성능 수생 바이오매스 개발

기 여 율 1/1

주관기관 한국생명공학연구원

연구기간 2010.10.22 ~ 2011.08.21

---

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

- a) 초음파 파쇄기를 이용하여 미세조류 세포를 균질화 하는 단계;
  - b) 메탄올 용매에 녹인 나일레드(Nile red) 염색약을 상기 균질화 된 미세조류 세포 샘플 1 ml 당 0.05 내지 0.15 ppm 농도로 처리하여 염색하는 단계; 및
  - c) 상기 염색된 미세조류 세포로부터 형광활성 세포분류기 (fluorescence activated cell sorter, FACS)를 이용하여 지질함량이 높은 세포를 분리하는 단계를 포함하는 미세조류 균주의 분리 방법으로,
- 상기 a) 단계의 초음파 파쇄 조건은 듀티싸이클(duty cycle) 50 내지 70%, 마이크로-팁 리미트(Micro-tip Limit) 3 내지 5, 프로브(probe) 직경 2 내지 4 mm에서 8 내지 12초 간 균질화하는 것을 특징으로 하고,
- 상기 c) 단계는 형광활성 세포분류기의 FITC-a 필터를 통해 여기(excite) 파장 영역이 400 내지 500 nm, 발광(emite) 파장 영역이 600 내지 700 nm인 형광파장신호를 검출하는 것을 특징으로 하는, 미세조류 균주의 분리 방법.

**청구항 2**

- 제 1항에 있어서,
- 상기 c) 단계에서 분리된 지질함량이 높은 세포를 재배양하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 미세조류 균주의 분리 방법.

**청구항 3**

- 제 1항에 있어서,
- 상기 a) 단계는 미세조류를 2000 내지 4000 rpm에서 1 내지 5분 간 원심분리한 후 초음파 파쇄기를 이용하여 미세조류 세포를 균질화 하는 것을 특징으로 하는, 미세조류 균주의 분리 방법.

**청구항 4**

삭제

**청구항 5**

삭제

**청구항 6**

삭제

**청구항 7**

삭제

**청구항 8**

삭제

**청구항 9**

삭제

**명세서**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 형광활성 세포분류기 (fluorescence activated cell sorter, FACS)와 나일레드(Nile red) 염색약을 이용하여 높은 지질함량을 가지는 미세조류 균주를 신속하게 분리하는 방법 및 이를 재배양하는 방법에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 최근 국제유가의 지속적인 상승으로 인해 신재생 에너지 개발에 대한 관심이 높아지고 있으며, 이에 따라 미세조류를 이용한 바이오에너지 개발에 대한 연구가 국내외 적으로 활발히 진행되고 있다. 특히, 미세조류는 대표적인 광합성 생물로서 높은 광합성 효율을 가지며, 일반 육상 식물에 비해 단위면적당 바이오매스 및 바이오디젤 생산이 1헥타르 당 130여 배에 이른다 (Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. Biotechnol. Adv. 25: 294-306). 현재까지 전 세계적으로 알려져 있는 미세조류 종(species)은 약 40,000종으로 추정되고 있으나, 이들 중 4%에 해당되는 1,600여 종만이 각국의 컬처컬렉션 (Culture Collection)에 의해 유지, 보존되는 것으로 알려지고 있다. 따라서 아직까지 알려지지 않은 더 많은 종류의 미세조류를 확보하고 이 중 높은 지질 함량을 지니고 바이오디젤 생산에 적합한 우량 미세조류 주(strain)의 분리 및 동정 작업이 필요하다 (오희목. 2010. 녹색기술동향보고서 2010 제 4호).

[0003] 미세조류로부터 지질함량을 측정하는 방법으로는 일반적으로 클로로포름과 메탄올을 이용한 용매추출법 (Bligh E.G. and W.J. Dyer.1959. A rapid method of total lipid extraction and purification.Can. J. Biochem. Physiol 37(8):911-917)이 많이 사용되고 있으나, 이는 다양한 현상으로부터 채취된 미세조류 주(strain)의 지질함량을 신속하게 측정하기에는 다소 어려움이 따르며, 신속하게 지질함량을 측정할 수 있는 방법이 필요하다. 현재 개발되어 있는 신속한 미세조류의 지질 정량법은 Nile red 염색약으로 염색한 후 형광을 측정하여 지질을 정량함으로써 단시간 내에 간편하고 신속하게 지질 함량을 측정하는 방법이 있다 (한국특허출원 제10-1998-0020708호).

[0004] 상기 미세조류 지질 정량법은 신속한 지질함량의 측정은 가능하나, 실시간으로 높은 지질함량을 지니는 각각의 균주 및 세포만을 따로 분리해 내기에는 어려움이 있고, Nile red 염색약을 녹여 사용하는 유기용매인 아세톤의 독성으로 인해 염색 후 세포의 생존여부가 불투명하며, Nile red 염색약이 250 ppm의 높은 농도로 첨가된다는 약점이 있다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0005] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위한 것으로서, 본 발명의 목적은 기존 방법의 Nile red 염색약 사용 농도를 줄이고, Nile red 염색약을 녹이기 위한 유기용매의 독성을 낮추어 균주 및 세포의 생존률을 높이며, Nile red 염색 후 지질염색 정도에 따른 선별적인 균주 분리와 해당 균주의 재배양 방법 등을 제공하고자 하는 것이다.

**과제의 해결 수단**

[0006] 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 a) 초음파 파쇄기를 이용하여 미세조류 세포를 균질화 하는 단계; b) 상기 균질화 된 미세조류 세포를 나일레드(Nile red)로 염색하는 단계; 및 c) 상기 염색된 미세조류 세포로부터 형광활성 세포분류기 (fluorescence activated cell sorter, FACS)를 이용하여 지질함량이 높은 세포를 분리하는 단계를 포함하는 미세조류 균주의 분리 방법을 제공한다.

[0007] 또한, 본 발명은 상기 c) 단계에서 분리된 지질함량이 높은 세포를 재배양하는 단계를 더 포함할 수도 있다.

[0008] 본 발명에 있어서, 상기 미세조류 세포를 균질화 하는 단계는 미세조류를 2000 ~ 4000 rpm에서 1 ~ 5분 간 원심 분리한 후 초음파 파쇄기를 이용하여 미세조류 세포를 균질화 할 수 있다.

[0009] 또한 본 발명에서, 상기 초음파 파쇄 조건은 duty cycle 50 ~ 70%, Micro-tip Limit 3 ~ 5, 프로브(probe) 직경 2 ~ 4 mm에서 8 ~ 12초 간 균질화 하는 것을 특징으로 한다.

[0010] 또한 본 발명에 있어서, 상기 나일레드(Nile red) 염색약은 무독성 유기용매에 녹여 사용하는 것을 특징으로 하며, 상기 무독성 유기용매는 알코올인 것을 특징으로 하며, 바람직하게는 메탄올 또는 에탄올을 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0011] 본 발명에서 상기 나일레드(Nile red) 염색약은 미세조류 샘플 1 ml 당 0.05 ~ 0.15 ppm 농도로 첨가하는 것이 바람직하다.

[0012] 또한 본 발명에 있어서, 상기 형광활성 세포분류기 (fluorescence activated cell sorter, FACS)를 이용하여 지질함량이 높은 세포를 분리하는 단계에서 형광활성 세포분류기의 FITC-a 필터의 exite 파장 영역이 400 ~ 500 nm, emite 파장 영역이 600 ~ 700 nm인 형광과장신호를 검출하는 것을 특징으로 한다.

**발명의 효과**

[0013] 본 발명에 따른 높은 지질함량을 가지는 미세조류 균주의 분리 방법은 초음파과쇄기 (sonicator)를 이용하여 세포를 균질화 함으로써 나일레드(Nile red) 염색약의 사용 농도를 1/10 수준으로 줄일 수 있으며, 이에 염색약에 의한 세포의 손상을 최소화할 수 있다. 또한, 본 발명의 균주 분리 방법은 나일레드(Nile red) 염색약을 녹이는 유기용매로 아세톤 대신 메탄올을 사용함으로써 세포에 미치는 독성을 급격히 낮추어 미세조류 세포의 생존률을 향상시킬 수 있다. 또한, 본 발명은 형광활성 세포분류기 (fluorescence activated cell sorter, FACS)를 이용함으로써 상대적으로 높은 지질을 함유하는 미세조류 균주를 보다 빠르고 정확하게 분리할 수 있으며, 각각 하나의 세포로 분리할 수 있는바, 이로부터 세포의 재배양이 가능하다.

**도면의 간단한 설명**

[0014] 도 1은 본 발명의 지질함량이 높은 미세조류 균주 분리 방법을 도식화한 순서도이다.  
 도 2는 본 발명의 일실시예에 따라 *Chlorella vulgaris* 균주 샘플을 원심분리한 결과이다.  
 도 3은 본 발명의 일실시예에 따라 *Chlorella vulgaris* 균주 샘플을 원심분리한 초음파 과쇄기로 균질화한 결과이다.  
 도 4는 본 발명의 일실시예에 따라 나일레드(Nile red) 염색약으로 염색한 *Chlorella vulgaris* 균주 샘플을 고속 라이브 공초점 현미경 (Ultrafast Live Scanning Microscope System, Carl Zeiss Microimaging GmbH, Germany)을 이용하여 촬영한 결과이다.  
 도 5는 본 발명의 일실시예에 따라 나일레드(Nile red) 염색약으로 염색한 *Chlorella vulgaris* 균주 샘플을 형광활성 세포분류기 (fluorescence activated cell sorter, FACS, Becton Dickinson and Company, USA)를 이용하여 분리한 결과이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0015] 본 발명은 미세조류 세포에 포함된 지질을 균질하게 염색하기 위한 세포 균질화 과정과, 균질화된 세포의 Nile red 염색 과정, 그리고 형광활성 세포분류기 (fluorescence activated cell sorter, FACS)를 이용하여 염색된 지질의 형광과장신호 (fluorescence emission signal)에 따라 높은 지질함량을 가지는 균주를 신속하게 분리하는 방법을 제공하며, 분리된 균주를 재배양하는 방법을 제공한다.

[0016] 본 발명자들은 기존의 나일레드(Nile red) 염색 방법에서 vortex로 세포 균질화를 유도하였던 것을 초음파 과쇄기 (sonicator)를 이용하여 미세조류 세포 간 공간분포를 균질하게 만들어 줌으로써, 종래 지질 염색에 이용되던 나일레드(Nile red) 염색시약의 처리 농도를 낮추고도 균질한 염색이 가능하게 유도하고, 나일레드(Nile red) 염색약을 녹이는 유기용매로써 독성이 높은 아세톤 대신에 메탄올을 사용함으로써 독성을 낮추어 세포 생존률을 높이며, 형광활성 세포분류기 (fluorescence activated cell sorter, FACS)를 이용함으로써, 상대적으로 높은 지질량을 함유하는 미세조류 균주를 선별적으로 빠르게 분리할 수 있음을 확인하였으며, 이와 같은 방법으로 분리된 균주를 재배양 할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0017] 본 발명의 미세조류 세포 분리 방법은 도 1에 간략히 나타내었다.

[0018] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0019] 실시예 1. *Chlorella vulgaris*의 신속한 지질염색 및 관찰

- [0020] 실험에 사용된 균주는 *Chlorella vulgaris*이다. 배양된 균주 1.5 ml을 3000 rpm에서 1분간 샘플의 원심분리를 진행하였으며, 원심분리된 pellet의 상태를 도 2에 나타내었다.
- [0021] 상기 원심분리된 샘플은 상등액을 제거하였으며, 남아 있는 pellet에는 1/2로 희석한 BG11 배지 1.5 ml를 첨가하였다. 최종적으로 세포와 배지는 2 : 1 부피비가 되도록 하였으며, 그 중 300  $\mu$ l의 샘플을 취하여 e-tube로 옮긴 후 초음파파쇄기 (sonicator, Vibra cell, Sonics & materials INC, USA)를 이용하여 세포 균질화 (sonication)를 실시하였으며, 세포 균질화 결과를 도 3에 나타내었다.
- [0022] 상기 세포 균질화 과정에서 초음파파쇄기 (sonicator)의 세부조건은 Duty cycle은 60%, Micro-Tip Limit은 4로 설정하였고, probe는 직경 3 mm (S&M 630-0418)를 사용하였으며 세포 균질화 (sonication) 시간은 10초로 유지하였다.
- [0023] Nile red 염색약은 10 ppm 농도를 사용하였으며, 최종적으로 샘플 1 ml 당 0.1 ppm의 농도가 되도록 처리하였으며, 염색반응 시간은 10분으로 진행하였다. 반응이 완료된 샘플은 더 이상의 반응을 막고자 1/2로 희석된 BG11 배지로 2회 수세하였다. 본 조건에 의해 지질염색이 잘 이루어지는 확인하기 위하여 고속 라이브 공초점 현미경 (Ultrafast Live Scanning Microscope System, Carl Zeiss Microimaging GmbH, Germany)을 이용하여 세포를 촬영하였으며, 그 결과는 도 4에 나타내었다.
- [0024] 구체적으로, 도 4에 의하면, 죽은 세포의 경우 염록체만 남아있어 Nile red 염색약에 의해 염색되지 않아 적색만이 관찰이 되었으며, 살아있는 세포의 경우 염록체 (적색)와 Nile red 염색약에 의해 노란색으로 염색된 세포의 지질부위(lipid body)가 관찰되었음을 알 수 있다.

[0025] 실시예 2. *Chlorella vulgaris*의 높은 지질을 가지는 균주의 신속한 분리

- [0026] *Chlorella vulgaris* C는 돌연변이 유발 화학물질 처리를 하지 않은 균주이고, 8 내지 18번의 균주는 각각 돌연변이 유발 화학물질 처리한 균주이며, *Chlorella vulgaris* K는 *Chlorella vulgaris*의 배양에 사용되는 형광등이 아닌 자외선 (UV)를 광원으로 이용하여 배양한 균주이다 (하기 표 1 참조).
- [0027] 상기 실시예 1에서 Nile red 염색약에 의해 염색된 각 균주들의 세포들은 형광활성 세포분류기 (fluorescence activated cell sorter, FACS, Becton Dickinson and Company, USA)를 이용하여 FITC-a 필터를 통해 400 ~ 500 nm 사이 영역의 excite와 600 ~ 700nm 사이 영역의 emite의 형광파장신호 (fluorescence emission signal)를 검출하였으며, 그 결과를 하기 표 1 및 도 5에 나타내었다.

[0028] [표 1]

Strains	Total cell numbers (all section)	High signal intensity (P1 section) cell numbers
<i>Chlorella vulgairs C</i>	20,000	84 (0.4%)
<i>Chlorella vulgairs 8</i>	20,000	84 (0.4%)
<i>Chlorella vulgairs 11</i>	19,999	152 (0.8%)
<i>Chlorella vulgairs 15</i>	20,000	510 (2.6%)
<i>Chlorella vulgairs 16</i>	20,000	585 (2.8%)
<i>Chlorella vulgairs 17</i>	20,000	139 (0.7%)
<i>Chlorella vulgairs 18</i>	19,996	111 (0.6%)
<i>Chlorella vulgairs K</i>	19,996	6 (0.03%)

[0029]

- [0030] 구체적으로, 상기 표 1 및 도 5에서 알 수 있는바와 같이 각각의 군주에 따라 정규분포를 이루는 피크(peak)에 차이가 나타났다. FITC-a 필터를 통해 나온 형광과장신호 중 지정된 상위 약 90% 이상의 피크 구간 (도 5의 P1 구간에 포함되어 높은 신호의 세기 (signal intensity)를 나타내는 군주의 세포들은 형광활성 세포분류기 (fluorescence activated cell sorter, FACS)를 통해 미세조류 배지가 첨가된 96-웰 플레이트(96 well plate)에 하나의 세포씩 분리할 수 있었으며, 각 웰(well)에 받아들인 세포들은 재배양이 가능하였다.
- [0031] 따라서 상기 실시예 1 및 2를 통해 Nile red 염색과 형광활성 세포분류기 (fluorescence activated cell sorter, FACS)를 활용하여 높은 지질함량을 가지는 군주를 신속하게 분리해 낼 수 있었으며, 분리된 각각의 세포는 재배양이 가능한 것을 확인하였다.
- [0032] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

**도면**

**도면1**



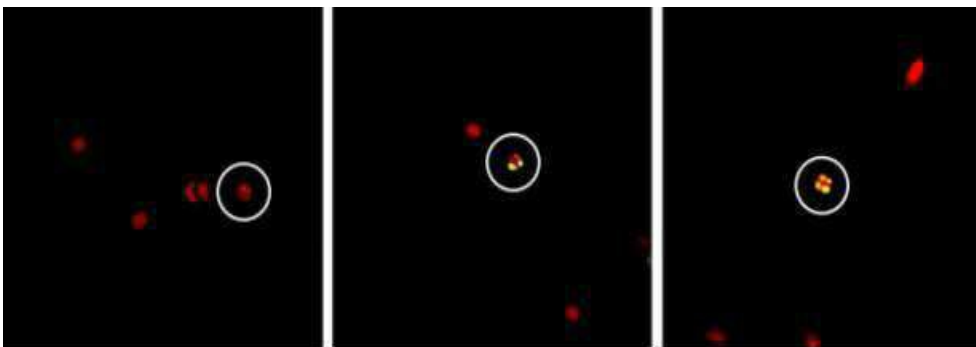
도면2



도면3



도면4





도면5

