

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2021-0093574
(43) 공개일자 2021년07월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12M 3/06 (2006.01) C12M 1/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12M 23/16 (2013.01)
C12M 21/12 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0007324
(22) 출원일자 2020년01월20일
심사청구일자 2020년01월20일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
최윤이
서울특별시 성북구 인촌로 44, 504호 (안암동3가)
박재원
부산광역시 남구 오륙도로 85, 109동 604호 (용호동, 오륙도 에스케이뷰 아파트)
박윤희
서울특별시 성북구 인촌로28길 21, 301호 (안암동5가)
(74) 대리인
특허법인 남앤남

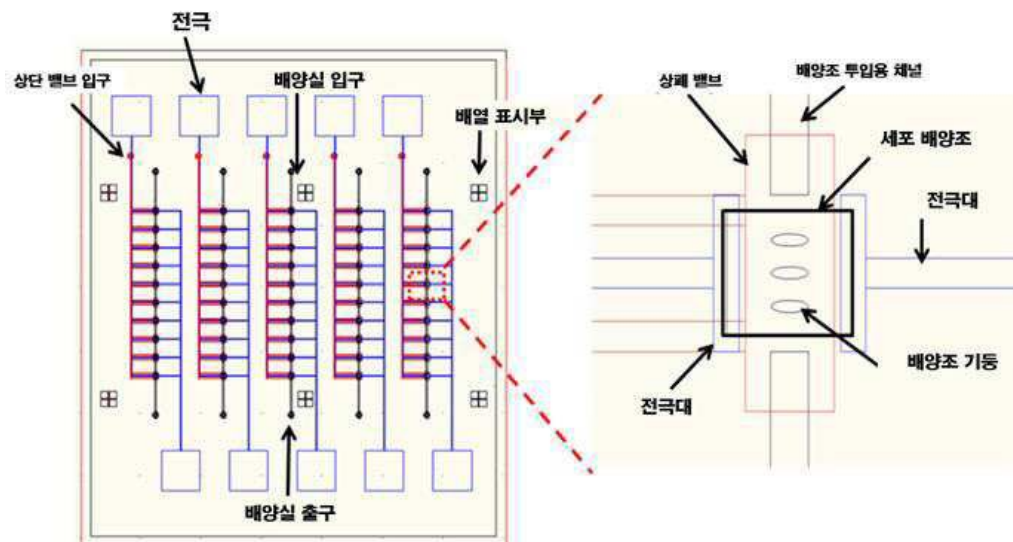
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 미생물의 유용물질 생산용 미세유체 칩

(57) 요약

본 발명은 미생물의 유용물질을 효과적으로 생산할 수 있는 미세유체 칩; 및 이를 이용한 미생물의 유용물질 생산 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 미소 전극층, 세포 배양층 및 공압 밸브층이 순차적으로 적층된 구조의 미세유체 칩을 이용하는 경우 미생물에 최적 조건의 전기 자극을 부가하여 고부가가치 물질 산물을 효과적으로 생산할 수 있다. 특히, 상기 세포 배양층 내(內) 각각의 유량 채널은 미소 전극층을 통해 서로 독립적인 전기 자극 조건이 가해질 수 있는바, 여러 가지 전기 조건 및 변수를 개별 세포 배양조에서 동시에 확인할 수 있는 이점을 갖는다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12M 29/14 (2013.01)

C12M 45/07 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 R1724413

부처명 해양수산부

과제관리(전문)기관명 해양수산과학기술진흥원

연구사업명 해양수산생명공학기술개발

연구과제명 [RCMS]미세조류(*Euglena* sp.)의 베타글루칸 생산성 개선을 위한 해양 미생물 응용기

술 개발

기 여 율 1/1

과제수행기관명 고려대학교 산학협력단

연구기간 2019.04.01 ~ 2020.01.31

명세서

청구범위

청구항 1

세포에 전기자극을 가하는 미소 전극층;

세포를 포함하는 유체의 이송을 위한 다수의 유량 채널을 포함하되, 상기 유량 채널은 다수의 세포 배양조 및 미세 기둥과 연결되는 세포 배양층; 및

음압(陰壓)을 통해 유체의 이동을 조절하는 폐쇄형 공압 밸브층이 순차적으로 적층된 구조를 갖는 미세유체 칩.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 세포 배양층은 폐쇄형 공압 밸브층에 음압이 가해지는 경우 유로(流路)를 개방하는 구조를 형성하고, 음압이 가해지지 않는 경우 유로(流路)를 차단하는 구조를 형성하는 미세유체 칩.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 유로(流路)를 개방하는 구조에서는 세포 배양층이 미소 전극층과 분리되며, 유로(流路)를 차단하는 구조에서는 세포 배양층이 미소 전극층과 접촉되는 것을 특징으로 하는 미세유체 칩.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 세포 배양층은 2 ~ 100개의 유량 채널을 가지며, 상기 1개의 유량 채널 당 2 ~ 100개의 배양조를 포함하며, 상기 1개의 배양조 당 2 내지 10개의 미세 기둥을 포함하는 것을 특징으로 하는 미세유체 칩.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 세포 배양층 내(內) 각각의 유량 채널은 서로 분리되어 유지되며, 채널에 유입되는 유체의 종류가 서로 간섭하지 않는 것을 특징으로 하는 미세유체 칩.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 세포 배양층 내(內) 각각의 유량 채널은 미소 전극층을 통해 서로 독립적인 전기자극 조건이 가해질 수 있는 것을 특징으로 하는 미세유체 칩.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 미세유체 장치는 미생물의 유용물질 생산용인 것을 특징으로 하는 미세유체 칩.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 미생물은 미세조류인 것을 특징으로 하는 미세유체 칩.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 미세조류는 헤마토코쿠스, 유글레나 또는 클로렐라인 것을 특징으로 하는 미세유체 칩.

청구항 10

제7항에 있어서,

상기 유용물질은 아스타잔틴, 베타카로틴 또는 바이오오일인 것을 특징으로 하는 미세유체 칩.

청구항 11

a) 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 미세유체 칩을 준비하는 단계;

b) 상기 미세유체 칩의 세포 배양층의 유량 채널 입구에 미생물을 포함하는 유체를 투입하고, 상기 미세유체 칩의 폐쇄형 공압 밸브층에 음압을 가하여 유로(流路)를 개방하여 미생물을 포함하는 유체를 세포 배양층에 채우는 단계;

c) 상기 미세유체 칩의 폐쇄형 공압 밸브층에 음압을 가하지 않아 유로(流路)를 차단하는 단계; 및

d) 상기 미세유체 칩의 미소 전극층을 통해 미생물에 전기자극을 가하는 단계를 포함하는, 미세유체 칩을 이용한 미생물의 유용물질 생산 방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 c) 단계는 유로(流路)를 차단함으로써 미생물의 이동을 막고, 유체의 건조를 방지하며, 세포 배양층이 미소 전극층과 접촉을 통해 전기가 흐르도록 하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제11항에 있어서,

상기 미생물은 미세조류인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 미세조류는 헤마토코쿠스, 유글레나 또는 클로렐라인 것을 특징으로 하는 미세유체 방법.

청구항 15

제11항에 있어서,

상기 유용물질은 아스타잔틴, 베타카로틴 또는 바이오오일인 것을 특징으로 하는 미세유체 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 미생물의 유용물질을 효과적으로 생산할 수 있는 미세유체 칩; 및 이를 이용한 미생물의 유용물질 생산 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 박테리아, 효모, 미세조류 등을 포함하는 단세포 생물체는 농업, 축산, 수산, 의약 및 자원 분야에서 여러 목적으로 사용되고 있다.

[0003] 여기서, 미세조류(microalgae)는 클로로필, 카로티노이드, 파이코빌린스 등과 같은 다양한 색소를 함유하고 있으며 광합성을 통해 세포 성장 및 이에 필요한 유기물질을 합성할 수 있는 단세포성 조류를 의미하며, 대부분의 식물성 플랑크톤이 여기에 속한다.

[0004] 박테리아와 효모는 의약품 단백질 발현에 사용되며, 미세조류는 광 에너지와 이산화탄소 및 무기물질을 이용하여 여러 유용물질을 생산해 낼 수 있어 그 관심이 집중되고 있다.

[0005] 예를들어 미세조류는 식물에 비하여 성장속도가 매우 빠르고 빛 에너지와 이산화탄소 및 무기물질로부터 바이오디젤로 전환이 가능한 중성지질을 다량으로 생산할 수 있으므로 화석연료의 대안으로 급부상하고 있으며 또한 이산화탄소를 이용하므로 지구 온난화가 문제가 되는 온실가스에 대한 해결책으로 주목받고 있다. 뿐만 아니라, 미세조류 중 특히 헤마토코쿠스 플루비알리스 (*Haematococcus pluvialis*)는 스스로 아스타잔틴의 생합성이 가능하며, 자연환경에서 아스타잔틴의 생산성이 가장 높은 균주로 알려져 있다. 아스타잔틴은 자연계에 존재하는 지용성 색소인 카로테노이드(Carotenoid)의 일종으로, 뛰어난 항산화 능력을 지니고 있어 자외선에 의한 눈과 피부 보호, 뇌신경 퇴화 질병 예방, 면역기능강화, 심혈관질환 예방 등의 기능을 갖는다. 따라서 아스타잔틴은 제약, 식품 산업 등에서 활발히 이용되며 높은 경제성(약 US\$ 2,500 kg-1)을 지닌 원료로써 각광받고 있다.

[0006] 이러한 배경 하에, 본 발명자는 미생물의 유용물질(아스타잔틴, 베타카로틴 또는 바이오오일 등)을 효과적으로 생산할 수 있는 미세유체 기반의 플랫폼을 개발하고자 하였으며, 그 결과 미소 전극층, 세포 배양층 및 공압 밸브층이 순차적으로 적층된 구조의 미세유체 장치를 이용하여 미생물을 배양하는 경우 유용물질을 효과적으로 생산할 수 있는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0007] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1998380호
(특허문헌 0002) 한국공개특허 제10-2016-0056797호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 따라서 본 발명의 목적은 미생물의 유용물질을 효과적으로 생산할 수 있는 미세유체 칩을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 미세유체 칩을 이용하여 미생물의 유용물질을 효과적으로 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 세포에 전기자극을 가하는 미소 전극층; 세포를 포함하는 유체의 이송을 위한 다수의 유량 채널을 포함하되, 상기 유량 채널은 다수의 세포 배양조 및 미세 기둥과 연결되는 세포 배양층; 및 음압(陰壓)을 통해 유체의 이동을 조절하는 폐쇄형 공압 밸브층이 순차적으로 적층된 구조를 갖는 미세유체 칩을 제공한다.

[0011] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 세포 배양층은 폐쇄형 공압 밸브층에 음압이 가해지는 경우 유로(流路)를 개방하는 구조를 형성하고, 음압이 가해지지 않는 경우 유로(流路)를 차단하는 구조를 형성할 수 있다.

[0012] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 유로(流路)를 개방하는 구조에서는 세포 배양층이 미소 전극층과 분리되며, 유로(流路)를 차단하는 구조에서는 세포 배양층이 미소 전극층과 접촉할 수 있다.

[0013] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 세포 배양층은 2 ~ 100개의 유량 채널을 가지며, 상기 1개의 유량 채널 당 2 ~ 100개의 배양조를 포함하며, 상기 1개의 배양조 당 2 내지 10개의 미세 기둥을 포함할 수 있다.

[0014] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 세포 배양층 내(內) 각각의 유량 채널은 서로 분리되어 유지되며, 채널에 유입되는 유체의 종류가 서로 간섭하지 않을 수 있다.

[0015] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 세포 배양층 내(內) 각각의 유량 채널은 미소 전극층을 통해 서로 독립적인 전기자극 조건이 가해질 수 있다.

[0016] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 미세유체 장치는 미생물의 유용물질 생산용일 수 있다.

- [0017] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 미생물은 미세조류일 수 있다.
- [0018] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 미세조류는 헤마토코쿠스, 유글레나 또는 클로렐라일 수 있다.
- [0019] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 유용물질은 아스타잔틴, 베타카로틴 또는 바이오오일일 수 있다.
- [0020] 또한, 본 발명은 a) 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 미세유체 칩을 준비하는 단계; b) 상기 미세유체 칩의 세포 배양층의 유량 채널 입구에 미생물을 포함하는 유체를 투입하고, 상기 미세유체 칩의 폐쇄형 공압 밸브층에 음압을 가하여 유로(流路)를 개방하여 미생물을 포함하는 유체를 세포 배양층에 채우는 단계; c) 상기 미세유체 칩의 폐쇄형 공압 밸브층에 음압을 가하지 않아 유로(流路)를 차단하는 단계; 및 d) 상기 미세유체 칩의 미소 전극층을 통해 미생물에 전기자극을 가하는 단계를 포함하는, 미세유체 칩을 이용한 미생물의 유용물질 생산 방법을 제공한다.
- [0021] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 c) 단계는 유로(流路)를 차단함으로써 미생물의 이동을 막고, 유체의 건조를 방지하며, 세포 배양층이 미소 전극층과 접촉을 통해 전기가 흐르도록 할 수 있다.
- [0022] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 미생물은 미세조류일 수 있다.
- [0023] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 미세조류는 헤마토코쿠스, 유글레나 또는 클로렐라일 수 있다.
- [0024] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 유용물질은 아스타잔틴, 베타카로틴 또는 바이오오일일 수 있다.

발명의 효과

- [0025] 본 발명에 따른 미소 전극층, 세포 배양층 및 공압 밸브층이 순차적으로 적층된 구조의 미세유체 칩을 이용하는 경우 미생물에 최적 조건의 전기 자극을 부가하여 고부가가치 물질 산물을 효과적으로 생산할 수 있다. 특히, 상기 세포 배양층 내(內) 각각의 유량 채널은 미소 전극층을 통해 서로 독립적인 전기자극 조건이 가해질 수 있는바, 여러 가지 전기 조건 및 변수를 개별 세포 배양조에서 동시에 확인할 수 있는 이점을 갖는다.

도면의 간단한 설명

- [0026] 도 1은 본 발명의 미세유체 칩의 전체적인 구조와 부분을 확대하여 도식화한 것이다.
- 도 2는 본 발명의 미세유체 칩의 세포 배양층 구조를 도식화한 것이다.
- 도 3은 본 발명의 미세유체 칩의 폐쇄형 공압 밸브층 구조를 도식화한 것이다.
- 도 4는 본 발명 미세유체 칩의 미소 전극층의 전극 배열 구조를 도식화한 것이다.
- 도 5a는 본 발명의 미세유체 칩에서 폐쇄형 공압 밸브층에 음압(陰壓)이 가해지는 경우 유로(流路)가 개방된 구조를 도식화한 것이다.
- 도 5b는 본 발명의 미세유체 칩에서 폐쇄형 공압 밸브층에 음압(陰壓)이 가해지지 않는 경우 유로(流路)가 차단된 구조를 도식화한 것이다.
- 도 6은 세포 배양층의 SU-8 형판을 나타낸 것이다.
- 도 7은 폐쇄형 공압 밸브층의 SU-8 형판을 나타낸 것이다.
- 도 8은 미소 전극층을 나타낸 것이다.
- 도 9는 본 발명의 미세유체 칩의 다이어그램 및 확대도를 나타낸 것이다.
- 도 10은 본 발명의 미세유체 칩 내 전기자극으로 자극된 미세조류 헤마토코쿠스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*)의 현미경 사진이다.
- 도 11은 라만 분광계를 이용한 헤마토코쿠스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*)의 아스타잔틴의 분석 결과를 나타낸 것이다(적 : 전기 자극이 없는 *H. pluvialis*의 아스타잔틴, 녹 : 전기 자극(1V, 0.5Hz)을 도입한 *H. pluvialis*의 아스타잔틴).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0027] 본 발명은 미소 전극층; 세포 배양층; 및 폐쇄형 공압 밸브층이 순차적으로 적층된 구조를 갖는 미세유체 칩에

대한 것이다.

- [0028] 본 명세서의 전체에 걸쳐서 어떤 구성 요소가 다른 구성 요소를 "포함"한다고 기재하는 경우에는, 특별히 반대되는 의미의 기재가 없는 한 임의의 다른 구성 요소를 제외하는 것이 아니라 임의의 다른 구성 요소를 더 포함할 수도 있다는 것을 의미할 수 있다.
- [0029] 더 나아가서, 어떤 구성 요소가 다른 구성 요소의 "연결된", "설치된" 또는 "설치되며"라고 기재한 경우에는, 이 구성 요소가 다른 구성 요소와 직접적으로 연결되어 있거나 접촉하여 설치되어 있을 수 있고, 일정한 거리를 두고 이격되어 설치되어 있을 수도 있으며, 일정한 거리를 두고 이격되어 설치되어 있는 경우에 대해서는 해당 구성 요소를 다른 구성 요소에 고정 내지 연결시키기 위한 제 3의 구성 요소 또는 수단이 존재할 수 있으며, 이 제 3의 구성 요소 또는 수단에 대한 설명은 생략될 수도 있음을 알아야 한다.
- [0030] 또한, 본 명세서에서 "상", "하", "좌", "우" 등의 위치와 관련된 용어는, 사용된다면, 해당 구성 요소에 대해서 해당 도면에서의 상대적인 위치를 나타내고 있는 것으로 이해하여야 하며, 이들의 위치에 대해서 절대적인 위치를 특정하지 않는 이상은, 이들 위치 관련 용어가 절대적인 위치를 언급하고 있는 것으로 이해하여서는 아니된다.
- [0031] 본 명세서에서는 각 도면의 각 구성 요소에 대해서 그 도면 부호를 명기함에 있어서, 동일한 구성 요소에 대해서는 이 구성 요소가 비록 다른 도면에 표시되더라도 동일한 도면 부호를 가지고 있도록, 즉 명세서 전체에 걸쳐 동일한 참조 부호는 동일한 구성 요소를 지시하고 있다.
- [0032] 본 명세서에 첨부된 도면에서 본 발명을 구성하는 각 구성 요소의 크기, 위치, 결합 관계 등은 본 발명의 사상을 충분히 명확하게 전달할 수 있도록 하기 위해서 또는 설명의 편의를 위해서 일부 과장 또는 축소되거나 생략되어 기술되어 있을 수 있고, 따라서 그 비례나 축척은 엄밀하지 않을 수 있다.
- [0033] 본 명세서에서 "미소 전극층"이라는 용어는, 마이크로 규모에서 전극들의 배열을 갖는 전극층을 의미한다.
- [0034] 본 명세서에서 "세포 배양층"이라는 용어는, 세포를 배양하는 층을 의미한다.
- [0035] 본 명세서에서 "폐쇄형 공압 밸브층"이라는 용어는, 공압식 수단을 통해 압력을 가할 수 있는 층으로, 기체 유입구가 폐쇄된 형태를 의미한다.
- [0036] 본 명세서에서 "채널"이라는 용어는, 상기 각 층에 배열되어 독립적인 조건을 형성할 수 있는 통로 또는 라인(line)을 의미하며, "유량 채널"이라 함은 세포 배양층에 형성되는 유체의 이송을 위한 채널을 의미한다.
- [0037] 본 명세서에서 "세포 배양조"라는 용어는, 세포를 배양하는 수조를 의미한다.
- [0038] 본 명세서에서 "미세 기둥"이라는 용어는, 마이크로 규모의 아주 작은 기둥을 의미한다.
- [0039] 본 명세서에서 "음압(陰壓)"이라는 용어는, 물체의 내부 압력이 외부 압력보다 낮은 상태로서, 외부의 공기가 안으로 밀려들어가는 상태를 의미한다.
- [0040] 이하, 도면을 참고로 하여 본 발명의 바람직한 실시예에 대하여 상세히 설명하면 다음과 같다.
- [0042] 도 1은 본 발명의 미세유체 칩의 전체적인 구조를 도식화한 것으로서, '상단 밸브 입구'는 폐쇄형 공압 밸브층의 상단에 위치하는 공기 흡입구로서, 상기 입구에 주사기, 바늘, 실리콘 튜브를 연결될 수 있다. '배양실 입구'는 세포 배양층의 유량 채널 입구에 해당하며, '배양실 출구'는 세포 배양층의 유량 채널 출구에 해당한다. '배열 표시부'는 본 발명의 미소 전극층, 세포 배양층 및 폐쇄형 공압 밸브층을 결합할 때 마크가 되는 부분으로, 각 층에 표시되어 있는 상기 배열 표시부를 일치시켜 결합을 형성할 수 있다.
- [0043] 본 발명의 미소 전극층, 세포 배양층 및 폐쇄형 공압 밸브층 각각의 층은 도 2 내지 도 4에서 자세히 나타내었다.
- [0044] 도 2는 본 발명의 미세유체 칩의 세포 배양층 구조를 도식화한 것이다. 세포 배양층은 5×10 배열로 각 채널에는 10개의 직사각형 배양조(길이 $500 \mu\text{m}$, 너비 $420 \mu\text{m}$)으로 구성되며, 각 배양조에는 3개의 작은 타원형(긴축 $145 \mu\text{m}$, 단축 $40 \mu\text{m}$) 미세 기둥이 있다. 각 채널의 너비는 $150 \mu\text{m}$ 이지만, 각 세포 배양조의 경우 $50 \mu\text{m}$ 의 거리를 두고 분리되어 있다. 유량 채널에는 입구와 출구가 있다(지름 $650 \mu\text{m}$). 본 발명의 상기 미세 기둥은 구조 지지대로서의 역할을 한다. 세포 배양조와 미세 기둥의 사이즈와 개수는 실제 요건에 따라 조정할 수 있다.

- [0045] 본 발명의 일구체예에서 상기 세포 배양층은 2 ~ 100개의 유량 채널을 가지며, 상기 1개의 유량 채널 당 2 ~ 100개의 배양조를 포함하며, 상기 1개의 배양조 당 2 내지 10개의 미세 기둥을 포함할 수 있으나, 특별히 그 개수를 제한하는 것은 아니다.
- [0046] 실제 하기 실시예에서, 본 발명의 미세유체 칩은 세포 배양층에 5개의 유량 채널, 상기 1개의 유량 채널 당 10개의 배양조 및 상기 1개의 배양조 당 3개의 미세 기둥을 가진 형태로 제작하였다.
- [0047] 도 3은 본 발명의 미세유체 칩의 폐쇄형 공압 밸브층 구조를 도식화한 것이다. 상기 폐쇄형 공압 밸브층은 세포 배양층 상부에 위치하며 공압을 제어하는 층으로, 5×10 배열로 각 채널의 상단에는 직경 650 μm의 입구가 있으며, 상기 입구는 공기 주입구로서 주사기, 바늘, 실리콘 튜브를 연결될 수 있다. 도 3의 오른쪽은 각 공압 밸브를 확대하여 도식화한 것으로서, 각각의 공압 밸브는 350 μm 너비 및 920 μm 길이로 이루어져 있다. 폐쇄형 공압 밸브층은 세포 배양층 상부에 위치하며 공압을 제어함으로써, 세포 배양층에 있는 세포의 이동을 조절하고, 유체의 건조를 방지하며, 세포 배양층이 미소 전극층과 접촉을 통해 전기가 흐르도록 하는 것을 조절하는 역할을 한다.
- [0048] 도 4는 본 발명의 미세유체 칩의 미소 전극층 구조를 도식화한 것이다. 상기 미소 전극층(두께 150nm, 폭 100nm)은 세포 배양층 하부에 위치하며 세포 배양층에 전기 자극을 가하는 층으로, 미소 전극 배열은 2×2 grid 유리 기판으로 구성된다.
- [0049] 본 발명의 미세유체 칩은 세포에 전기자극을 가하는 미소 전극층; 세포를 포함하는 유체의 이송을 위한 다수의 유량 채널을 포함하되, 상기 유량 채널은 다수의 세포 배양조 및 미세 기둥과 연결되는 세포 배양층; 및 음압(陰壓)을 통해 유체의 이동을 조절하는 폐쇄형 공압 밸브층이 순차적으로 적층된 구조를 갖는다.
- [0050] 도 5a에서 나타난 바와 같이, 본 발명의 상기 세포 배양층(2)은 폐쇄형 공압 밸브층(3)에서 공압 유입기(32)를 통해 음압(陰壓)이 가해지는 경우 유로(流路)를 개방하는 구조를 형성하고, 상기 유로(流路)를 개방하는 구조에서는 세포 배양층(2)이 미소 전극층(1)과 분리되는 구조를 형성한다.
- [0051] 한편, 도 5b에서 나타난 바와 같이, 폐쇄형 공압 밸브층(3)에서 공압 유입기(32)를 통해 음압(陰壓)이 가해지지 않는 경우 유로(流路)를 차단하는 구조를 형성한다. 상기 유로(流路)를 차단하는 구조에서는 세포 배양층(2)이 미소 전극층(1)과 접촉되는 구조를 형성한다.
- [0052] 상기와 같은 특징을 갖는 본 발명의 미세유체 칩은 미생물의 유용물질 생산을 위한 용도로 사용될 수 있다. 즉, 배양하고자 하는 미생물에 전기 자극을 가하여 미생물로부터 유용물질을 효과적으로 생산할 수 있는 용도를 갖는다.
- [0053] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 미생물은 미세조류일 수 있으며, 상기 미세조류는 헤마토코쿠스, 유글레나 또는 클로렐라일 수 있으나, 특별히 그 종류를 한정하는 것은 아니다.
- [0054] 본 발명의 다른 구체예에서, 상기 유용물질은 아스타잔틴, 베타카로틴 또는 바이오오일일 수 있으나, 특별히 그 종류를 한정하는 것은 아니다.
- [0055] 본 발명의 하기 실시예에서는, 미생물로서 헤마토코쿠스 종(species)인 헤마토코쿠스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*)를 본 발명의 미세유체 칩에 배양하였으며, 유용물질로 아스타잔틴을 생산하였다.
- [0056] 본 발명의 미세유체 칩은 폐쇄형 공압 밸브층을 필수구성으로 포함하는데, 이러한 폐쇄형 공압 밸브층은 세포 배양층 상부에 위치하며 공압을 제어함으로써, 세포 배양층에 있는 세포의 이동을 조절하고, 유체의 건조를 방지할 수 있으며(세포 배양층에 세포를 로딩하는 경우 2주 이상을 마르지 않고 유지할 수 있음), 세포 배양층이 미소 전극층과 접촉을 통해 전기가 흐르도록 하는 것을 조절하는 역할을 한다.
- [0057] 그러므로, 본 발명의 미세유체 칩은 편모로 이동이 가능한 미생물의 배양에 더욱 효과적으로 사용될 수 있다. 편모를 갖는 미생물의 경우 편모를 이용하여 배양조에서 이탈할 수 있는바, 이러한 미생물의 이동을 막을 수 있는 수단이 필요하다.
- [0058] 본 발명은 또한, a) 상기 미세유체 칩을 준비하는 단계; b) 상기 미세유체 칩의 세포 배양층의 유량 채널 입구에 미생물을 포함하는 유체를 투입하고, 상기 미세유체 칩의 폐쇄형 공압 밸브층에 음압을 가하여 유로(流路)를 개방하여 미생물을 포함하는 유체를 세포 배양층에 채우는 단계; c) 상기 미세유체 칩의 폐쇄형 공압 밸브층에 음압을 가하지 않아 유로(流路)를 차단하는 단계; 및 d) 상기 미세유체 칩의 미소 전극층을 통해 미생물에 전기 자극을 가하는 단계를 포함하는, 미세유체 칩을 이용한 미생물의 유용물질 생산 방법에 관한 것이다.

- [0059] 본 발명의 상기 a) 단계는 미세유체 칩을 준비하는 단계이다. 본 발명의 미세유체 칩은 상기에서 설명한 바와 같이, 미소 전극층; 세포 배양층; 및 폐쇄형 공압 밸브층이 순차적으로 적층된 구조를 갖는다.
- [0060] 본 발명의 상기 b) 단계는 유체를 세포 배양층에 채우는 단계로서, 자세하게는 상기 미세유체 칩의 세포 배양층(2)의 유량 채널 입구(221)에 미생물을 포함하는 유체를 투입하고, 상기 미세유체 칩의 폐쇄형 공압 밸브층(3)에 음압을 가하여 유로(流路)를 개방하여 미생물을 포함하는 유체를 세포 배양층에 채우는 단계이다. b) 단계에서는 세포 배양층(2)이 미소 전극층(1)과 분리되는 구조를 형성한다(도 5a 참조).
- [0061] 본 발명의 상기 c) 단계는 유로(流路)를 차단하는 단계로서, 자세하게는 상기 미세유체 칩의 폐쇄형 공압 밸브층(3)에 음압을 가하지 않아 유로(流路)를 차단하는 단계이다. c) 단계에서는 세포 배양층(2)이 미소 전극층(1)과 접촉되는 구조를 형성한다(도 5b 참조).
- [0062] 본 발명의 상기 d) 단계는 미생물에 전기자극을 가하는 단계로서, 자세하게는 상기 미세유체 칩의 미소 전극층(1)을 통해 세포 배양층(2)에 있는 미생물에 전기자극을 가하는 단계이다.
- [0063] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 미생물은 미세조류일 수 있으며, 상기 미세조류는 헤마토코쿠스, 유글레나 또는 클로렐라일 수 있다. 바람직하게는 상기 미세조류는 헤마토코쿠스 종(species)일 수 있으며, 예를 들어, 헤마토코쿠스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*)일 수 있다
- [0064] 본 발명의 다른 구체예에서, 상기 유용물질은 아스타잔틴, 베타카로틴 또는 바이오오일일 수 있으나, 특별히 그 종류를 한정하는 것은 아니다.
- [0066] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0068] **<실시예 1>**
- [0069] **미세조류 전기자극 미세유체 칩 설계**
- [0070] 본 발명의 미세조류 전기자극 미세유체칩은 AutoCAD 소프트웨어를 사용하여 개발되었다. 고해상도 노출 마스크를 제작하기 위해 미세유체 칩은 3개의 층으로 나누어 제작하였다.(세포 배양층(도 2), 폐쇄형 공압 밸브층(도 3), 미소 전극 배열층(도 4)). 각 층의 리소그래피(Lithography) 층을 제작하였다. 그래픽 구조의 크기와 후에 사용될 포토레지스트(Photoresist)의 종류에 따라서, 세포 배양층, 폐쇄형 공압 밸브층은 음극 마스크 형태(구조물 내부의 광 투과, 외부에서 광 불투과)로 제조하였으며, 미소 전극층은 양성 마스크 형태(구조물 내부 광투과, 외부에서 광 불투과)로 제작하였다.
- [0072] **<실시예 2>**
- [0073] **미세조류 전기자극 미세유체 칩 형판 제조 과정**
- [0075] **<2-1> 세포 배양층 형판 제조**
- [0076] 세척 및 건조과정이 완료된 3 인치 실리콘 웨이퍼에 45um 두께의 네거티브 포토레지스트 SU-8(Micro-Chem, SU-8 2025)를 30초간 2,000 rpm으로 회전 도포한 뒤, 95℃에서 10분간 프리 베이킹(pre-baking) 과정을 거쳤다. 이후, 상기 웨이퍼 위에 필름 마스크를 덮은 다음 260 mJ/cm²의 자외선에 노출시키고(UV-lithography), 95℃에서 10분간 포스트 베이킹 과정을 거쳤다(post-baking). 베이킹을 마친후 PGMEA(Micro-Chem, SU-8 developer)용액에 담궈 노광되지 않은 부위를 선택적으로 제거함으로써 5×10 배열의 패턴을 갖는 세포 배양층 형판을 제조하였다(도 6 참조).
- [0078] **<2-2> 공압 밸브층 형판 제조**
- [0079] 세척 및 건조과정이 완료된 3 인치 실리콘 웨이퍼에 65um 두께의 네거티브 포토레지스트 SU-8(Micro-Chem, SU-8

2025) 층을 30초간 2,000 rpm으로 회전 도포한 뒤, 95℃에서 10분간 프리 베이킹(pre-baking) 과정을 거쳤다. 이후, 상기 웨이퍼 위에 필름 마스크를 덮은 다음 260 mJ/cm²의 자외선에 노출시키고(UV-lithography), 95℃에서 10분간 포스트 베이킹 과정을 거쳤다(post-baking). 베이킹을 마친후 PGMEA(Micro-Chem, SU-8 developer)용액에 담궈 노광되지 않은 부위를 선택적으로 제거함으로써 5×10 배열의 패턴을 갖는 공압 밸브층 형판을 제조하였다(도 7 참조).

[0081] <2-3> 미소 전극 배열층 제조

[0082] 전자 빔 증발에 의해 깨끗하게 건조된 2×2 인치 유리기판에 금 150nm 두께를 도금하고 접착층의 경우 30nm 크롬을 이용하였다. 이후, 금 도금 유리기판에 1μm 두께의 positive photoresist rzj-304(Suzhou ruihong)를 균일하게 도포하여 초박화한 후 원하는 미소전극 배열 패턴을 제작하였다. 습식 식각과정에는 금(Type TFA, Transene) 및 크롬(Type 1020, Transene) 식각 용액을 사용하여 파지티브 포토레지스트(positive photoresist)를 제거한 후 금 미소전극 배열층을 제조하였다(도 8 참조).

[0084] <실시예 3>

[0085] 미세조류 전기자극 미세유체 칩 형판을 통한 폴리디메틸실록산(PDMS) 기반의 미세유체 칩 제조 과정

[0086] 미세조류 전기자극 미세유체 칩은 높은 광 투명성, 접착성, 화학적 관성 및 기타 특성을 지닌 폴리디메틸실록산(polydimethylsiloxane, PDMS)의 연질 식각공법(Soft Lithography)을 활용하였다. 제조방법은 다음과 같다.

[0087] 먼저, 고분자 PDMS(Polydimethylsiloxane)와 경화제를 10:1 비율로 섞어 ‘PDMS 용액’을 제조하였다. 페트리 접시에 상기 <실시예 2>에서 제조된 공압 밸브층 형판을 고정시키고 PDMS 용액(2-3mm 두께)을 붓고 진공 상태에서 기포를 제거하고 80℃에서 1시간 동안 오븐에서 구웠다. 상기 공압 밸브층 형판에서 경화된 PDMS를 떼어내고 기체 주입구에 구멍을 뚫었다(구멍의 지름 : 1mm).

[0088] 한편, 접착 균질 처리제(MicroChem)를 도포한 세포 배양층 형판에 80μm 두께의 PDMS 용액을 도포하고 80℃에서 1시간 동안 오븐에 구운 뒤 10분간 방치하였다.

[0089] 올바르게 천공된 공압 밸브층 PDMS와, 상기 PDMS 용액이 도포된 세포 배양층 형판을 플라즈마 코팅기에 넣은 다음 정렬하고 밀봉하여 공압 밸브층이 세포 배양층 위에 있고 배양층 양쪽에 유로를 연결할 수 있도록 하였다.

[0090] 세포 배양층 형판에서 플라즈마를 이용한 밀봉 후 이중층(세포 배양층 + 공압 밸브층)의 PDMS를 탈착한 후 세포 배양층의 유량 채널 입구 및 출구에 직경 1mm의 구멍을 뚫었다.

[0091] 이후, 플라즈마 처리를 통해 밀봉된 이중층(세포 배양층 + 공압 밸브층) PDMS와 2×2 금 미소전극이 배열된 유리기판을 플라즈마 코팅기에 1분간 넣었다. 공압 제어층의 공기 흡입구에 10ml 주사기, 바늘, 실리콘 튜브를 연결하여 진공 형태로 제조하였다.

[0092] PDMS 멤브레인 챔버 아래의 정상적으로 닫힌 밸브 연결층을 위로 올린 뒤 이중층 PDMS(세포 배양층 + 공압 밸브층)와 미소전극 배열 유리기판을 조절하여 세포 배양층의 유로 부분 하단에 있는 공압 밸브층은 미소 전극 배열 유리기판으로 밀봉되지 않는다. 동시에, 각 쌍의 미소전극은 플라즈마 코팅 중 세포 배양층과 결합된다. 즉, 이중층(세포 배양층 + 공압 밸브층)을 플라즈마 코팅기를 이용하여 결합을 진행한 뒤 결합된 이중층 PDMS 디바이스와 미소전극 배열 유리 기판을 하단에 배열하고 배열 표시부(기판에서 십자가 모양)를 관찰하며 배열을 하였으며, 그 결과 미소전극층과 PDMS는 결합이 되지만 밸브는 닫혀있으며 위에 존재하기 때문에 세포 배양층에 영향을 미치지 않는다.

[0093] 상기와 같은 과정을 걸쳐 본 발명의 미세조류 전기자극 미세유체 PDMS칩을 제조하였다.

[0095] <실시예 4>

[0096] 제조한 미세조류 전기자극 미세유체 칩에서 전기자극을 통한 실험법

[0097] 미세조류 전기자극 미세유체 칩은 5×10 배열의 패쇄형 공압 밸브를 가지고 있어 5×10 배열의 각 배양조가 독립된 세포 배양조로 유지되며, 세포, 배양 시 사용되는 배지 및 전극을 통한 전기 자극이 세포 배양조 사이에서

서로 간섭하지 않는다. 폐쇄형 공압 밸브층의 공기 흡입구의 경우 주사기와 연결되어있다. 음압(陰壓)을 가하면 폐쇄형 공압 밸브층 아래의 세포 배양층의 PDMS가 위로 상승한다. 세포 배양층에 있는 양쪽 유로가 각 배양조와 연결되어있으며, 세포 접종을 통한 배양을 할 수 있다. 음압(陰壓)을 가하지 않을 경우 폐쇄형 공압 밸브층 하단에 있는 세포 배양층 양쪽에 있는 유로의 PDMS를 Qbottom에 있는 미소 전극 유리 기판과 연결하고, 세포 배양층 양측에 있는 유로(流路)를 분리하여 독립된 세포 배양 단위를 형성한다. 미세조류 전기자극 미세유체 칩에 전기자극을 가하는 실험 과정은 다음과 같다.

- [0098] (1) 기 설계된 미세조류 선별 미세유체 칩을 활용하여 플라스크에서 배양된 헤마토코쿠스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*) 중 성장단계의 세포만 전기자극 실험을 위해 선별하였다.
- [0099] (2) 10ml 주사기를 사용하여 폐쇄형 공압 밸브층의 공기 흡입구에 음압(陰壓)을 가하여, 폐쇄된 공압 밸브층 아래 세포 배양층의 PDMS를 들어올린 후 (유로(流路)의 경우 세포 배양층과 연결되어 있음), 배양층 입구를 통해 헤마토코쿠스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*)를 주입 펌프를 이용하여 주입하였다.
- [0100] (3) 세포 배양층에 헤마토코쿠스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*) 접종 후, 폐쇄형 공압 밸브층에 더 이상 음압(陰壓)을 가하지 않아 닫히게 되며 PDMS 세포 배양조의 양 부분은 미세 전극의 유리 기판과 다시 연결되었다. 각각의 세포 배양조와 연결된 유로(流路)는 단절되며 독립적인 배양과 자극을 부여할 수 있다.
- [0101] (4) 세포 접종 이틀 경과 후, 세포 배양조 하단의 미세 전극 배열을 8채널 자극 발생기(stg-4008, multi-channel system)와 연결하여 다른 전기 자극 변수 및 조건을 독립적인 세포 배양조에 있는 미세조류에 부여하였다.
- [0102] (5) 배양 첫날부터 역상 현미경을 이용하여 배양조의 헤마토코쿠스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*)의 실시간 상태와 행동을 촬영하였다(도 10 참조).
- [0103] (6) 다른 전기 자극 부여 배양 조건에서 헤마토코쿠스 플루비알리스(*Haematococcus pluvialis*)의 아스타잔틴 생산량을 라만 분광계를 이용하여 정량적으로 분석하였다. 정량 분석 결과는 도 11에 나타내었으며, 라만분광계를 이용하여 1516cm^{-1} , 1157cm^{-1} 파장대에서 아스타잔틴을 확인하였다. 도 11에서 빨간색 실선은 배양 6일차에 전기 자극이 없는 조건에서의 비교군이며, 초록색 실선은 배양 6일차에 전기 자극(1V, 0.5Hz)을 부여한 실험군을 나타낸 것이다. 도 11에서 초록색 실선이 높은 피크를 보이는 것은 자극 미부여 비교군과 비교하여 전기자극을 부여한 실험군에서 높은 아스타잔틴 생산을 보여주는 것이다. 참고로, 1516cm^{-1} , 1157cm^{-1} 파장대의 피크는 기존 논문에서 아스타잔틴의 피크로 알려져 있으며, 이에, 해당 피크가 나타나면 아스타잔틴이 생산되었음을 의미하는 것이다.
- [0105] 한편, 상기 전기조건(1V, 0.5Hz) 이외의 높은 전압 조건에서는 배지가 증발되는 현상이 나타나 아스타잔틴의 생산에 1V를 초과하는 조건은 적합하지 않는 것을 확인할 수 있었다.
- [0107] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

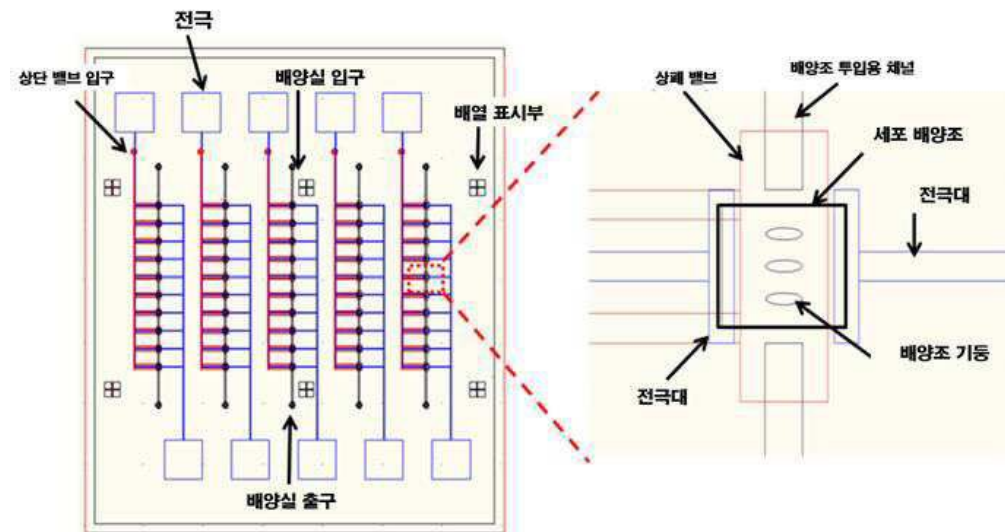
부호의 설명

- [0108] 1: 미소 전극층
2: 세포 배양층
3: 폐쇄형 공압 밸브층
21: 유량 채널
22: 배양조

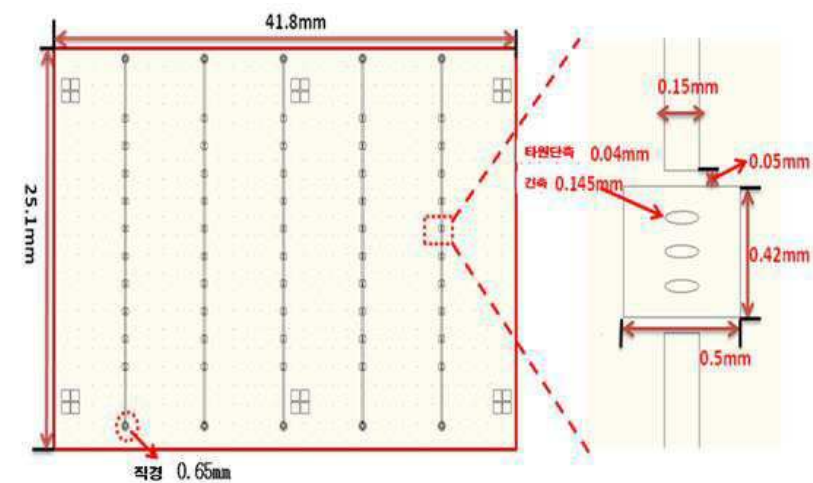
- 23: 미세 기둥
- 221: 유량 채널 입구
- 31: 공압 유입을 통한 제어부
- 32: 공압 유입구

도면

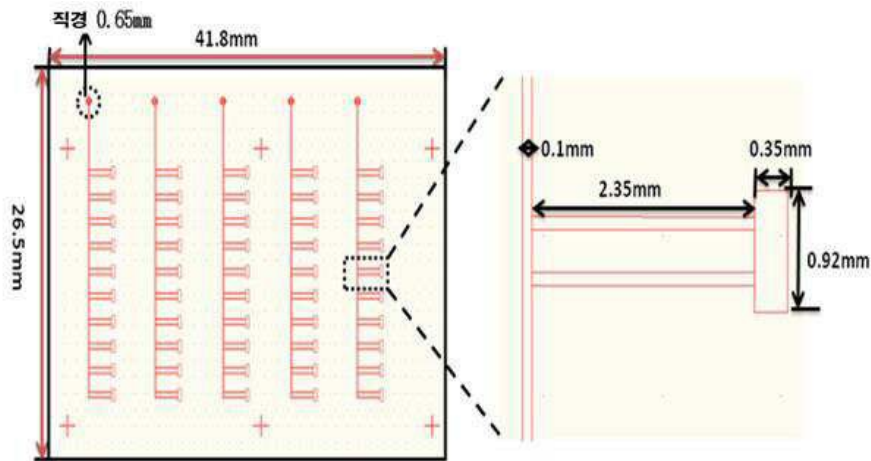
도면1



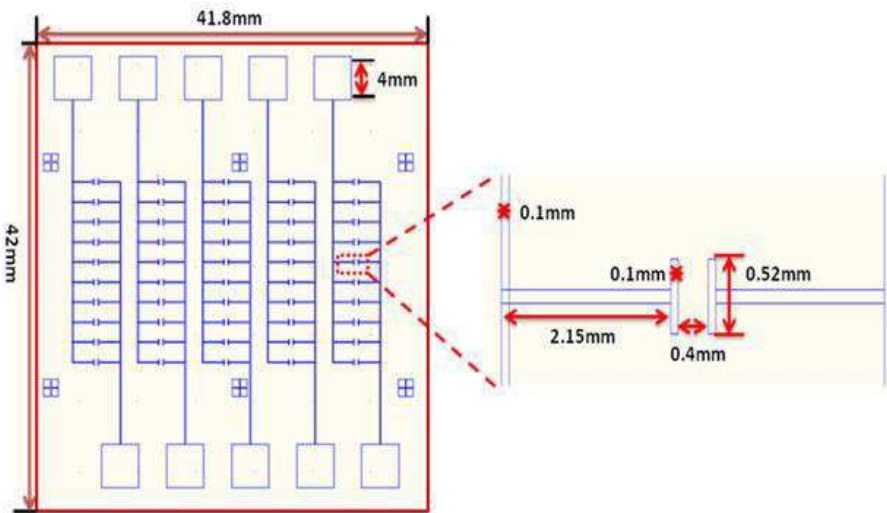
도면2



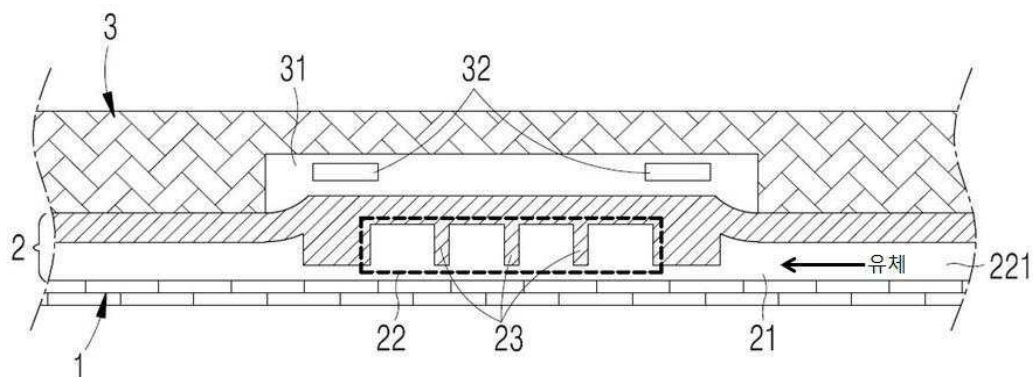
도면3



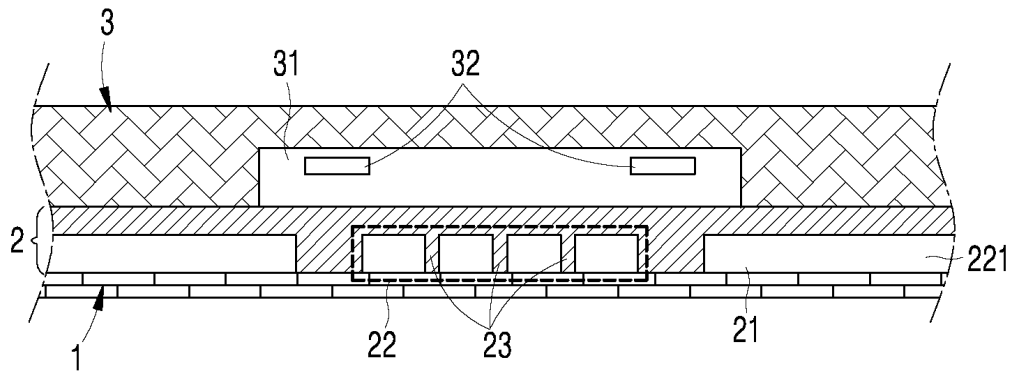
도면4



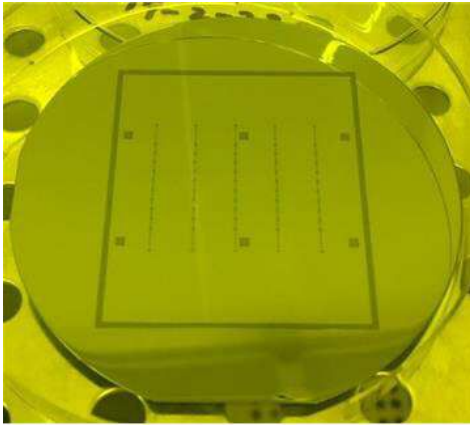
도면5a



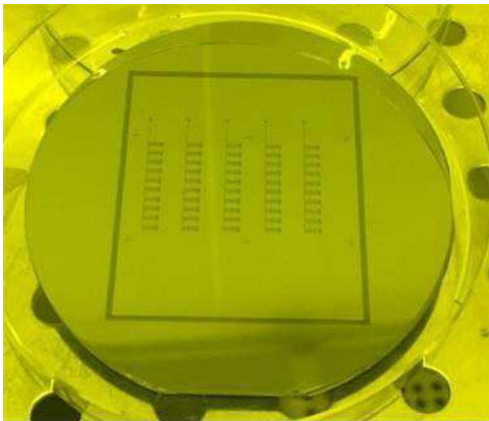
도면5b



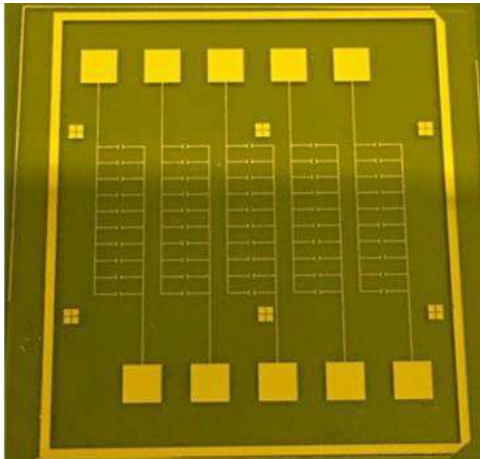
도면6



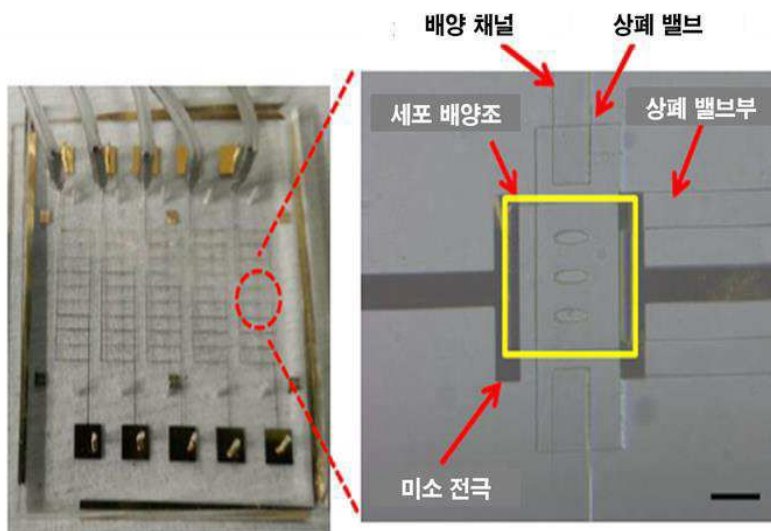
도면7



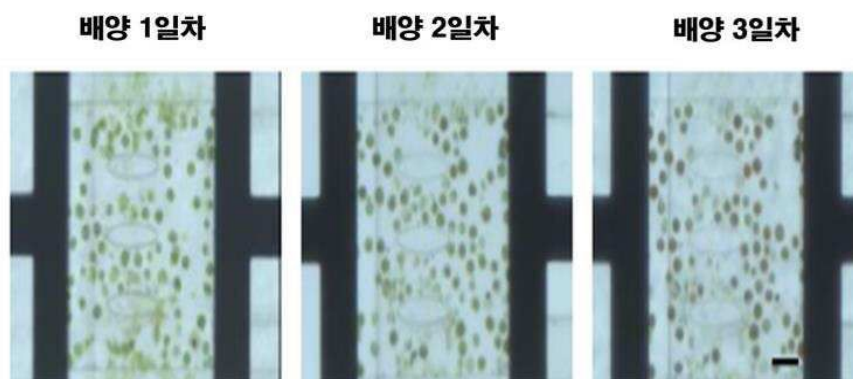
도면8



도면9



도면10



도면11

