(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년07월09일
(11) 등록번호 10-1998380
(24) 등록일자 2019년07월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12M 3/06 (2006.01) *C12M 1/42* (2017.01)
C12N 1/12 (2006.01) *C12P 23/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12M 23/16 (2013.01)
C12M 35/04 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0028676
(22) 출원일자 2018년03월12일
심사청구일자 2018년03월12일
(56) 선행기술조사문헌
WO2017027643 A1*
JP2007515958 A
KR1020050005341 A
Ho Seok Kwak et.al., A Microreactor System for Cultivation of Haematococcus pluvialis and Astaxanthin Production, J. Nanosci. Nanotechnol., Vol.15, No.2, pp.1618-1623,(2015.)
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
최윤이
서울특별시 성북구 인촌로 44, 504호 (안암동3가)
한상일
서울특별시 노원구 동일로241나길 10, A동 401호 (상계동, 현대맨션)
박재원
부산광역시 남구 오륙도로 85, 109동 604호 (용호동, 오륙도 에스케이뷰 아파트)
(74) 대리인
특허법인 남앤남

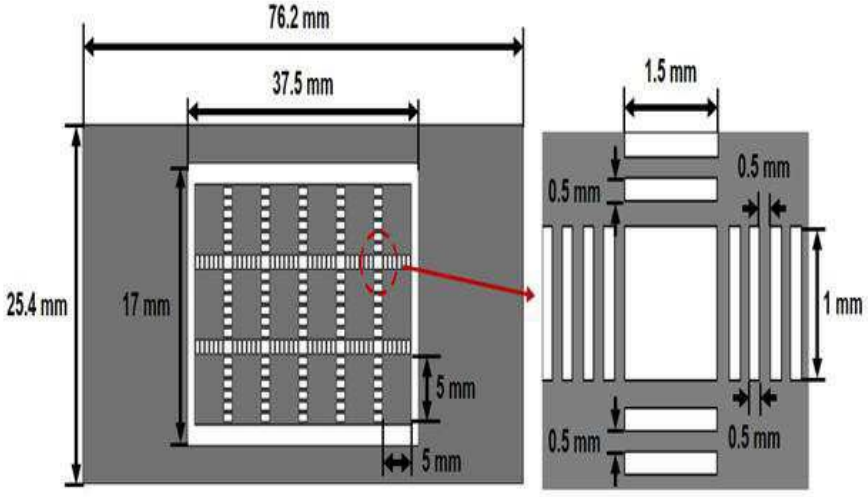
전체 청구항 수 : 총 5 항 심사관 : 조상진

(54) 발명의 명칭 **아스타잔틴 생산용 미세유체 장치 및 이를 이용한 아스타잔틴 생산방법**

(57) 요 약

본 발명은 아스타잔틴 생산용 미세유체 장치 및 이를 이용한 아스타잔틴 생산방법에 관한 것으로, 구체적으로 본 발명은 기판; 상기 기판 상에 패턴화되어 고정된 다수의 마이크로필름; 및 상기 마이크로필름 상에 위치되어 일정 압력을 가할 수 있는 유리 슬라이드;로 구성되며, 상기 마이크로필름은 10~20㎛의 높이를 가지는 것을 특징으로 하는 미세조류 배양을 통한 아스타잔틴 생산용 미세유체 장치, 상기 미세유체 장치를 이용한 아스타잔틴 생산용 미세조류의 배양방법 및 상기 본 발명의 미세유체 장치를 이용하여 배양된 미세조류로부터 아스타잔틴을 추출 및 분리하는 단계를 포함하는 아스타잔틴의 대량생산 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12N 1/12 (2019.02)
C12P 23/00 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

기판;

상기 기판 상에 패턴화되어 고정된 다수의 마이크로필름; 및

상기 마이크로필름 상에 위치되어 일정 압력을 가할 수 있는 유리 슬라이드;로 구성되며,

상기 마이크로필름은 10~20㎛의 높이를 가지고,

상기 패턴화는 10~20㎛의 높이, 1~1.2㎜의 세로 및 0.3~0.5㎜의 가로를 갖는 직육면체의 마이크로필름이 0.3~0.5㎜의 간격으로 상기 기판 상에 가로측 패턴 및 세로측 패턴이 형성되도록 다수개 배열되어 있으며,

상기 유리 슬라이드는 헤마토코쿠스 플루비알리스의 배양기간 동안 상기 헤마토코쿠스 플루비알리스에 물리적 자극을 가하여 아스타잔틴의 축적 및 생산을 증진시키는 것을 특징으로 하는,

헤마토코쿠스 플루비알리스 배양을 통한 아스타잔틴 생산용 미세유체 장치.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 기판은 유리 기판, 플라스틱 기판 또는 아크릴 기판인 것을 특징으로 하는, 헤마토코쿠스 플루비알리스 배양을 통한 아스타잔틴 생산용 미세유체 장치.

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항에 따른 아스타잔틴 생산용 미세유체 장치를 이용한 아스타잔틴 생산용 헤마토코쿠스 플루비알리스 미세조류의 배양방법에 관한 것으로,

상기 아스타잔틴 생산용 미세유체 장치에 헤마토코쿠스 플루비알리스를 $2x10^6$ cells/mL~ $2x10^8$ cells/mL의 세포 밀도가 되도록 주입하고,

유리 슬라이드로 압력을 가하여 상기 헤마토코쿠스 플루비알리스에 배양기간 동안 물리적 자극을 가하는 단계를 포함하는, 아스타잔틴 생산용 헤마토코쿠스 플루비알리스의 배양방법.

청구항 6

삭제

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 배양기간은 5~10일인 것을 특징으로 하는, 아스타잔틴 생산용 헤마토코쿠스 플루비알리스의 배양방법.

청구항 8

삭제

청구항 9

제5항의 방법으로 배양된 헤마토코쿠스 플루비알리스로부터 아스타잔틴을 추출 및 분리하는 단계를 포함하는, 아스타잔틴 대량생산 방법.

청구항 10

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 아스타잔틴 생산용 미세유체 장치 및 이를 이용한 아스타잔틴 생산방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 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.

[0003] 산업적 원료로써 아스타잔틴은 크게 천연 아스타잔틴과 합성 아스타잔틴의 두 가지 경로로 공급된다. 그러나 효능 및 안전성 등의 이유로 인해 천연 아스타잔틴이 더욱 선호된다. 천연 아스타잔틴은 일반적으로 새우, 바다가재, 연어, 도미, 송어 등의 어류 및 갑각류에 주로 함유되어 있다고 알려져 있지만, 이들은 스스로 아스타잔틴을 생합성 할 수 없으므로 먹이사슬을 통해 미세조류 등으로부터 섭취한다.

[0004] 미세조류 중 특히 헤마토코쿠스 플루비알리스 (*Haematococcus pluvialis*)는 스스로 아스타잔틴의 생합성이 가능하며, 자연환경에서 아스타잔틴의 생산성이 가장 높은 균주로 알려져 있다. 따라서 헤마토코쿠스 플루비알리스로부터 아스타잔틴을 직접 생산하여 원료로 이용하는 방법이 주목을 받고 있다.

[0005] 미세조류인 헤마토코쿠스 플루비알리스는 주변의 환경 조건이 악화될 경우 산화 스트레스를 받게 되어 세포 내에 활성산소를 생성하고, 이에 대처하기 위해 세포 내에 항산화 물질인 아스타잔틴을 축적하는 특성을 지니고 있다. 따라서 헤마토코쿠스 플루비알리스의 아스타잔틴 축적을 유도하기 위해 세포에 다양한 스트레스 조건을 도입하는 연구가 활발히 진행되고 있으며, 이러한 기술로서 광도, pH, 염분, 온도의 조절 및 질소, 인산염 결핍 등의 환경 자극에 대한 연구 결과가 주를 이루고 있을 뿐, 미세조류 생명공학 기술에 기반을 둔 물리적 자극에 대한 연구는 거의 진행되지 않고 있다.

[0006] 현재까지 개발된 환경 자극의 경우, 최적화된 배양 조건을 유지하기가 까다롭고 특정 배양 설비가 요구되는 등의 단점이 존재하므로 이를 개선할 수 있는 새로운 방법의 개발이 필요하다.

[0007] 이에, 본 발명자들은 종래의 기술에서 탈피하여 아스타잔틴의 생합성이 가장 우수한 미세조류로 알려진 헤마토코쿠스 플루비알리스를 미세유체 장치를 이용해 배양함으로써 균주의 아스타잔틴 축적을 효과적으로 유도하고 함량을 증가시킬 수 있는 새로운 기술을 개발함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-1782105호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 따라서 본 발명의 목적은 아스타잔틴 축적을 효과적으로 유도하고 함량을 증진시킬 수 있는 미세조류 배양을 통

한 아스타잔틴 생산용 미세유체 장치를 제공하는 것이다.

[0010] 또한 본 발명의 다른 목적은 본 발명에 따른 미세유체 장치를 이용한 아스타잔틴 생산용 미세조류의 배양방법을 제공하는 것이다.

[0011] 또한 본 발명의 다른 목적은 본 발명의 방법으로 배양된 미세조류로부터 아스타잔틴을 추출 및 분리하는 단계를 포함하는 아스타잔틴의 대량생산 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기와 같은 목적을 달성하기 위해 본 발명은, 기판; 상기 기판 상에 패턴화되어 고정된 다수의 마이크로필름; 및 상기 마이크로필름 상에 위치되어 일정 압력을 가할 수 있는 유리 슬라이드;로 구성되며, 상기 마이크로필름은 10~20㎛의 높이를 가지는 것을 특징으로 하는 미세조류 배양을 통한 아스타잔틴 생산용 미세유체 장치에 관한 것이다.

[0013] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 기판은 유리, 플라스틱 또는 아크릴 기판일 수 있다.

[0014] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 패턴화는 10~20㎛의 높이, 1~1.2㎜의 세로 및 0.3~0.5㎜의 가로를 갖는 직육면체의 마이크로필름이 0.3~0.5㎜의 간격으로 상기 기판 상에 가로측 패턴 및 세로측 패턴이 형성되도록 다수개 배열되어 있는 것일 수 있다.

[0015] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 미세조류는 헤마토코쿠스 플루비알리스일 수 있다.

[0016] 또한 본 발명은 본 발명에 따른 미세유체 장치를 이용한 아스타잔틴 생산용 미세조류의 배양방법에 관한 것으로, 상기 아스타잔틴 생산용 미세유체 장치에 미세조류를 주입하고, 상기 유리 슬라이드로 압력을 가하여 상기 미세조류에 배양기간 동안 물리적 자극을 가하는 단계를 포함한다,

[0017] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 미세조류의 주입은 미세조류 세포밀도가 $2x10^6$ cells/mL~ $2x10^8$ cells/mL이 되도록 주입하는 것일 수 있다.

[0018] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 배양기간은 5~10일 일 수 있다.

[0019] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 미세조류는 헤마토코쿠스 플루비알리스일 수 있다.

[0020] 또한 본 발명은 본 발명의 방법으로 배양된 미세조류로부터 아스타잔틴을 추출 및 분리하는 단계를 포함하는, 아스타잔틴 대량생산 방법을 제공한다.

[0021] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 미세조류는 헤마토코쿠스 플루비알리스일 수 있다.

발명의 효과

[0022] 본 발명에 따른 미세유체 장치를 이용한 아스타잔틴 생산방법은 종래의 생산방법에 비해 아스타잔틴을 단기간에 고함량으로 생산할 수 있는 효과가 있으며, 또한 본 발명에 따른 미세유체 장치는 미세조류 유래 유용물질의 생산에도 활용할 수 있으며, 유사한 미세조류에도 적용이 가능한 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 본 발명에 따른 헤마토코쿠스 플루비알리스의 배양을 위한 미세유체 장치의 모식도이다.

도 2는 본 발명에 따른 미세유체 장치를 이용한 미세조류 헤마토코쿠스 플루비알리스의 배양 모식도이다.

도 3은 헤마토코쿠스 플루비알리스의 외형을 관찰한 사진을 나타낸 것으로, (a)는 본 발명의 미세유체 장치를 이용하여 배양한 헤마토코쿠스 플루비알리스의 세포 형태를 나타낸 것이고, (b)는 본 발명의 미세유체 장치를 이용하지 않은 상태에서 배양한 대조군인 헤마토코쿠스 플루비알리스의 세포 형태를 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명의 미세유체 장치를 이용하여 배양한 실험군 및 미세유체 장치를 이용하지 않고 배양한 대조군에 대한 전체 아스타잔틴 생산량과 세포밀도(A)를 나타낸 것이고, 세포수당 생산한 아스타잔틴의 양을 측정한 결과(B)를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 본 발명은 아스타잔틴을 생산할 수 있는 미세조류를 물리적 자극 하에서 배양하도록 하여 아스타잔틴의 세포 내

축적향상 및 생산량 증진 효과를 갖도록 하는 미세조류 배양을 통한 아스타잔틴 생산용 미세유체 장치에 관한 것이다.

[0025] 구체적으로 본 발명의 미세조류 배양을 통한 아스타잔틴 생산용 미세유체 장치는, 기판; 상기 기판 상에 패턴화되어 고정된 다수의 마이크로필름; 및 상기 마이크로필름 상에 위치되어 일정 압력을 가할 수 있는 유리 슬라이드로 구성되며,이때 상기 마이크로필름은 10~20㎛의 높이를 가지는 것을 특징으로 한다.

[0026] 보다 구체적으로 본 발명의 미세유체 장치의 모식도는 도 1에 나타나 있는데, 기판 상에 패턴화되어 고정된 다수의 마이크로필름이 위치되도록 하였으며, 10~20㎛의 높이, 1~1.2㎜의 세로 및 0.3~0.5㎜의 가로를 갖는 직육면체의 마이크로필름이 0.3~0.5㎜의 간격으로 상기 기판 상에 가로측 패턴 및 세로측 패턴이 형성되도록 다수개 배열되도록 하였고, 소정 간격으로 10~20㎛의 높이, 1~1.2㎜의 세로 및 1.3~1.5㎜의 가로를 갖는 직육면체의 마이크로필름이 위치되도록 하였다.

[0027] 본 발명에서 상기 마이크로필름의 높이가 10~20㎛이 되도록 한 것은, 마이크로필름의 높이가 10 μm 미만이면 세포의 성장이 저해 될 우려가 있고, 20 μm를 초과하면 세포에 물리적 자극을 전달하지 못할 우려가 있으므로 본 발명에서 미세유체 장치 제조 시 마이크로필름의 높이는 10 ~ 20 μm로 하는 것이 좋으며, 바람직하게는 15 μm로 하는 것이 좋다.

[0028] 또한, 도 1에 나타낸 바와 같이, 마이크로필름은 일정 간격을 두고 위치되어 있는데, 이는 본 발명의 미세유체 장치의 구조적인 측면에서 기둥 역할과 함께 압력 조절 역할을 하도록 하였고, 세포배양 배지의 흐름을 조절할 수 있도록 하기 위함이다.

[0029] 또한 상기 기판은 세포를 배양할 수 있는 용도로 사용되는 기판이라면 모두 사용 가능하며, 이에 제한되지는 않으나 유리, 플라스틱 또는 아크릴 기판을 사용할 수 있다.

[0030] 본 발명에 따른 미세유체 장치는 아스타잔틴을 생산할 수 있는 균주라면 모두 적용가능하지만, 특히 물리적 자극에 의해 아스타잔틴의 생산량을 증진시킬 수 있는 균주에 적용하는 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 헤마토코쿠스 속 (*Haematococcus* sp.)의 헤마토코쿠스 플루비알리스 (*Haematococcus pluvialis*)일 수 있다.

[0031] 앞서 종래 기술에서도 언급했던 바와 같이, 아스타잔틴은 환경자극 또는 물리적 자극을 통해 아스타잔틴의 축적을 증진시킬 수 있다. 그러나 아스타잔틴을 생산할 수 있는 미세조류를 포함하는 균주들은 각 균주들이 가지는 고유의 특성에 의해 아스타잔틴의 축적 증진에 반응하는 자극이 다르다. 따라서 최대의 아스타잔틴을 생산하기 위해서는 아스타잔틴 생산 미세조류 또는 균주별 최적의 자극 조건을 확립하는 것이 필요하다.

[0032] 이러한 점에서 본 발명은 아스타잔틴의 생산성이 가장 높은 균주로 알려져 있는 헤마토코쿠스 플루비알리스 미세조류로부터 아스타잔틴 축적 및 생산을 최대화 할 수 있는 미세조류 배양장치를 개발하였고, 물리적 자극 조건을 확립하였다는 점에 기술적 의의가 있다.

[0033] 최적의 자극 조건으로, 앞서 기술한 바와 같이 마이크로필름의 높이 이외에도 본 발명의 미세유체 장치에 배양할 미세조류의 크기도 최대 20 μm의 크기를 갖는 세포(미세조류), 바람직하게는 10 ~ 15 μm의 크기를 갖는 세포(미세조류)를 배양하는 것이 좋다.

[0034] 상기 미세유체 장치에 아스타잔틴을 생산하는 균주를 배양할 때에, 미세조류 세포의 크기가 10 μm 미만이면 물리적 자극을 강하게 받지 못할 우려가 있고, 15 μm를 초과하면 과도한 압력에 의해 균주의 생존율이 감소할 우려가 있으므로, 본 발명의 미세유체 장치를 이용하여 아스타잔틴을 생산하는 균주의 배양은 균주의 세포 크기가 10 ~ 15 μm를 갖는 세포를 선택하여 배양하는 것이 좋다.

[0035] 또한, 세포 배양 시, 세포 밀도는 최대 2×10^{8} cells/mL로 하는 것이 좋으며, 바람직하게는 2×10^{6} cells/mL~2×10^{8} cells/mL의 범위에서 배양하는 것이 좋다.

[0036] 이는 세포 밀도가 2×10^{8} cells/mL를 초과하면 과도한 세포밀도에 의해 아스타잔틴의 생산량 및 균주의 생존율이 감소되는 문제점이 있으며, 2×10^{6} cells/mL 미만의 세포밀도로 배양하게 되면, 아스타잔틴의 생산량이 저하되는 문제점이 있기 때문이다.

[0037] 본 발명의 미세유체 장치를 이용한 아스타잔틴 생산 균주의 배양에 사용되는 배양배지는 종래 아스타잔틴 생산 균주의 배양에 사용되는 배지와 동일한 배지를 사용할 수 있다.

[0038] 또한 본 발명의 미세유체 장치를 이용하여 아스타잔틴 생산 균주의 배양은 추가적으로 특정 파장의 LED 광원 이용, 온도 조절, pH 조절 등 종래 아스타잔틴을 생산하기 위한 균주의 배양 및 자극 조건을 추가적으로 처리할 수 있다.

[0039] 따라서 본 발명은 본 발명의 미세유체 장치를 이용한 아스타잔틴 생산용 미세조류의 배양방법을 제공할 수 있으며, 상기 방법은 상기 아스타잔틴 생산용 미세유체 장치에 미세조류를 주입하고, 상기 유리 슬라이드로 압력을 가하여 상기 미세조류에 배양기간 동안 물리적 자극을 가하는 단계를 포함한다.

[0040] 또한, 본 발명의 방법으로 아스타잔틴 생산용 미세조류는 6~10일간 배양할 수 있으며, 바람직하게는 6일의 짧은 배양 기간만으로도 배양된 미세조류로부터 고함량의 아스타잔틴을 수득할 수 있다.

[0041] 나아가 본 발명은 상기 본 발명의 배양방법으로 배양된 미세조류로부터 아스타잔틴을 추출 및 분리하는 단계를 포함하는 아스타잔틴의 대량생산 방법을 제공할 수 있다.

[0042] 본 발명의 일실시예에서는, 본 발명의 미세유체 장치를 이용하여 배양된 세포 및 본 발명의 미세유체 장치를 이용하지 않고 배양된 세포에 대한 아스타잔틴 축적 효과를 분석하였는데, 그 결과 본 발명의 장치를 이용하여 물리적 압력이 가해진 상태에서 배양된 세포는 대조군에 비해 아스타잔틴을 세포 내에 다량 축적하고 있는 것으로 나타났고, 세포 당 아스타잔틴의 함량의 대조군에 비해 약 3배 이상 증가되어 있는 것으로 나타났다.

[0043] 따라서 이러한 결과를 통해, 본 발명자들은 본 발명의 아스타잔틴 생산용 미세유체 장치를 이용할 경우, 미세조류 균주에 직접적으로 물리적인 압력을 가한 상태로 배양할 수 있도록 하여 배양된 미세조류로부터 아스타잔틴의 축적을 증가시킬 수 있어 고함량의 아스타잔틴을 생산할 수 있는 효과가 있으며, 종래 화학적 방법에 비해 단기간에 아스타잔틴의 생산 효율을 증진시킬 수 있는 효과가 있고, 본 발명의 장치를 구성하고 있는 구성부들이 광투과성 물질로 구성되어 있어 광원조절 등의 추가적인 자극을 병용할 수 있는 효과가 있다.

[0044]

[0045] 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.

[0047] **<실시예 1>**

[0048] **헤마토코쿠스 플루비알리스 배양을 위한 미세유체 장치의 제조**

[0049] 헤마토코쿠스 플루비알리스의 배양을 위한 미세유체 장치는 포토리소그래피(photolithography) 공정을 통해 미세구조를 패터닝하여 제조하였는데, 먼저 유리 슬라이드에 음성감광제(photoresist) SU-8을 회전 도포한 후 디자인된 필름 마스크를 덮고 자외선에 노출시켜 미세구조 패턴 디바이스(Microstructure pattern device)를 제작하였다. 이후 120 ℃ 드라이 오븐에 10분간 넣어 점착성을 향상시키고 광학 3D 표면 형상 측정기(Optical 3D profilometer)를 이용하여 균일한 높이로 제작되었는지를 확인하였다. 보다 자세하게 설명하면 다음과 같다.

[0050] 1. 먼저 유리 슬라이드를 아세톤, 이소프로필알코올, 증류수를 이용하여 순차적으로 세척하였다.

[0051] 2. 세척 된 유리 슬라이드에 SU-8을 30초간 2,000 rpm으로 회전 도포하였다.

[0052] 3. 이후 유리 슬라이드를 65 ℃에서 2분간 방치한 후 90 ℃에서 10분간 더 방치하였다.

[0053] 4. 상기 제조된 유리 슬라이드는 기판 상에 올리고, 상기 유리 슬라이드 위에 필름 마스크를 덮은 다음, 260 mJ/cm^2의 자외선에 노출시켰다.

[0054] 5. 제작된 미세구조 패턴 디바이스를 65 ℃에서 2분간 방치한 후 90 ℃에서 10분간 더 방치하였다.

[0055] 6. 현상액을 이용하여 SU-8을 3분간 현상시켰다.

[0056] 7. 이소프로필알코올을 이용하여 디바이스를 세척하였다.

[0057] 8. 120 ℃ 드라이 오븐에 10분간 넣어 점착성을 향상시켰다.

[0058] 9. 광학 3D 표면 형상 측정기(Optical 3D profilometer)를 이용하여 균일한 높이를 확인함으로써, 본 발명의 헤마토코쿠스 플루비알리스의 배양을 위한 마이크로필름 미세유체 장치를 제조하였다. 제조된 본 발명의 장치에 대한 도면은 도 1에 나타내었고, 미세구조 패턴에 따른 장치 내에서의 구체적인 간격, 높이, 너비의 크기도 도 1에 나타내었다.

[0060] <실시예 2>

[0061] 본 발명의 미세유체 장치를 이용한 헤마토코쿠스 플루비알리스의 배양

[0062] 헤마토코쿠스 플루비알리스는 Optimal Haematococcus Medium (OHM)을 이용하여 배양하였다. 배지의 조성은 1L 당 KNO_3 0.41 g, Na_2HPO_4 0.03 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.246 g, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.11 g, Fe(III)-citrate H_2O 2.62 mg, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.011 mg, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.012 mg, Cr_2O_3 0.075 mg, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.98 mg, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.12 mg, SeO_2 0.005 mg, Biotin 25 μg, Thiamine 17.5 μg, B_{12} 15 μg이 되도록 하였고, 배양 전 고압멸균기를 이용하여 121 ℃, 20분 조건에서 살균처리한 후 사용하였다. 아스타잔틴을 생산하기 위한 균주의 배양은 상기 실시예 1에서 제조한 본 발명의 미세유체 장치를 이용하여 배양하였고, 이때 대조군으로는 미세유체 장치를 사용하지 않은 것을 사용하였으며, 실험군 및 대조군 모두 10일간 배양하였다. 이때 본 발명의 미세유체 장치를 이용하여 배양할 경우, 장치가 가지는 구조적인 특징으로 인해 물리적 스트레스를 균주에 가하게 하였다9도 2 참조).

[0063] 구체적으로, 미세유체 장치에 헤마토코커스 플루비알리스의 배양은 파이펫을 이용하여 미세유체 장치에 헤마토코커스 플루비알리스를 도포하였고, 유리 슬라이드를 이용하여 접합시킨 후 집게와 네오디뮴 자석을 이용하여 주변을 강하게 눌러주어 밀봉하는 방식으로 수행하였다.

[0064] 또한 아스타잔틴을 생산하기 위한 헤마토코쿠스 플루비알리스의 배양은 25 ℃, 50 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$의 백색 LED 조건으로 설정된 광생물반응기에서 이루어졌으며, 이 때 배지의 건조 및 누출을 막기 위해 실험군과 대조군의 겉면을 파라필름으로 밀봉하고, 습도를 일정하게 유지해주었다.

[0066] 이상의 방법으로 배양하는 과정에서 세포의 형태학적 변화를 현미경을 통해 직접 관찰하였는데, 그 결과 도 3에 나타낸 바와 같이, 미세유체 장치를 적용하지 않은 대조군은 일부 세포만이 낭종 형태로 변화한 것으로 확인할 수 있었으나(도 3a), 본 발명의 미세유체 장치를 이용한 경우, 대부분의 세포가 낭종 형태로 변화한 것을 확인할 수 있었으며, 세포 내 붉은색으로 보이는 아스타잔틴도 상당량 존재하는 것으로 나타났다(도 3b).

[0067]

[0068] <실시예 3>

[0069] 본 발명의 미세유체 장치를 이용한 헤마토코쿠스 플루비알리스의 아스타잔틴 생산량 분석

[0070] 본 발명의 미세유체 장치에서 헤마토코쿠스 플루비알리스를 배양한 군과 동일 환경에서 미세유체 장치를 사용하지 않은 것을 대조군으로 하여 10일간 배양 후 각 미세조류로부터 생산된 아스타잔틴의 함량을 측정하였다.

[0071] 아스타잔틴의 농도 분석은, 분광분석기 (Spectrophotometer)를 이용하여 측정하였는데, 세포 1 mL를 피펫으로 채취하여 4000 rpm 및 4 ℃에서 5분간 원심분리 후 상층액을 제거하고 멸균수 1 mL를 이용하여 3회 세척하였다. 이후 90% 아세톤 1 mL를 첨가하고 0.5mm와 1.0mm의 글래스비드(Glass beads)와 비드비터(Bead-beater)를 이용해 2분씩 2회 반복하여 세포를 파쇄한 다음, 세포 내의 색소를 아세톤으로 용출시켰다. 이후 상층액을 피펫으로 채취하여 분광분석기에서 OD_{474}를 측정하였다. 이후 아스타잔틴의 함량은 다음 식에 따라 계산하였다:

[0072] 아스타잔틴 (mg/L) = $7.0881 \times OD_{474} - 0.5904$

[0074] 상기 결과로부터 세포당 아스타잔틴 함량은 상기 계산된 아스타잔틴의 농도를 세포 밀도로 나누어 분석하였고, 대조군과 실험군의 세포당 아스타잔틴 함량을 비교하였다.

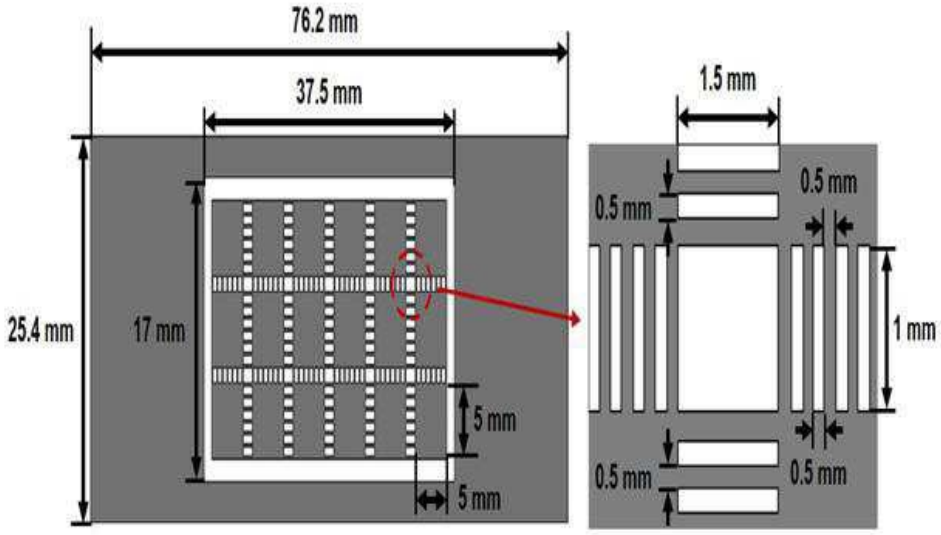
[0075] 상기에서 세포의 밀도는 현미경과 세포계수기, 혈구계수기를 각각 이용하여 측정하였으며, 실험군의 세포수는 세포계수기(Cell counter)를 이용하여 미세유체 장치 내의 세포 수를 측정한 후 미세유체 장치의 부피(Volume)를 mL로 환산하여 계산하였다. 대조군의 세포수는 대조군으로부터 15 μL를 피펫으로 채취한 후 혈구계수기(Hemacytometer)와 세포계수기를 이용하여 계산하였다.

[0077] 분석 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 미세유체 장치를 이용한 실험군이 대조군에 비해 아스타잔틴의 생산량이 현저하게 증가한 것으로 나타났고, 세포밀도는 대조군에 비해 더 낮은 것으로 나타났다(도 4a 참조). 이는 즉, 적은 수의 헤마토코쿠스 플루비알리스 미세조류만으로도 효과적으로 아스타잔틴을 생산할 수 있음을 의미한다. 세포 당 아스타잔틴의 양을 측정한 결과, 대조군은 세포수당 약 3pg의 아스타잔틴을 생산하는 것으로 나타난 반면, 본원발명의 미세유체 장치를 이용하여 배양한 군은 세포수 당 약 9pg의 아스타잔틴을 생산하는 것으로 나타나, 대조군에 비해 약 3배의 우수한 생산 효율을 보이는 것으로 나타났다(도 4b 참조).

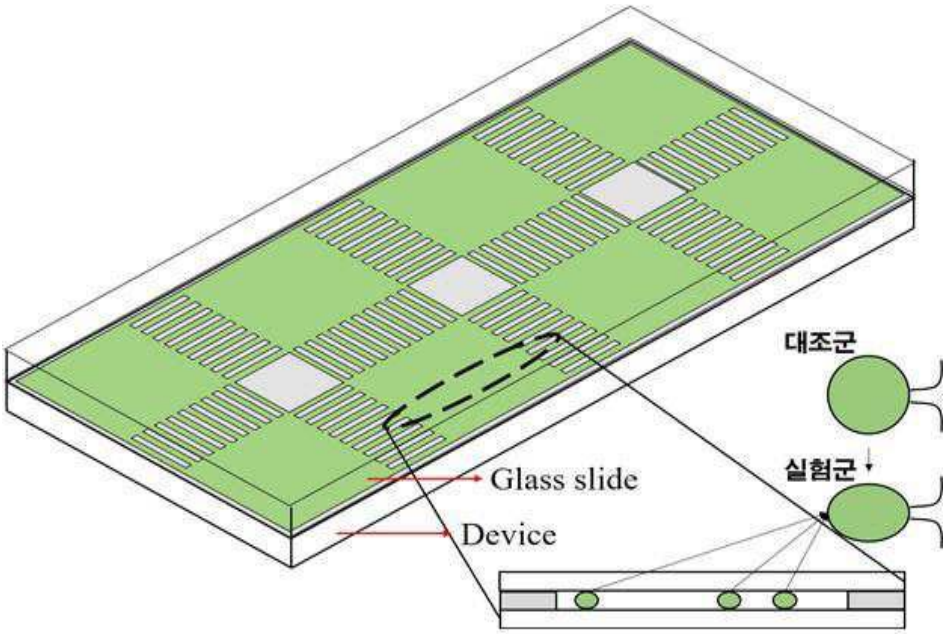
[0079] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

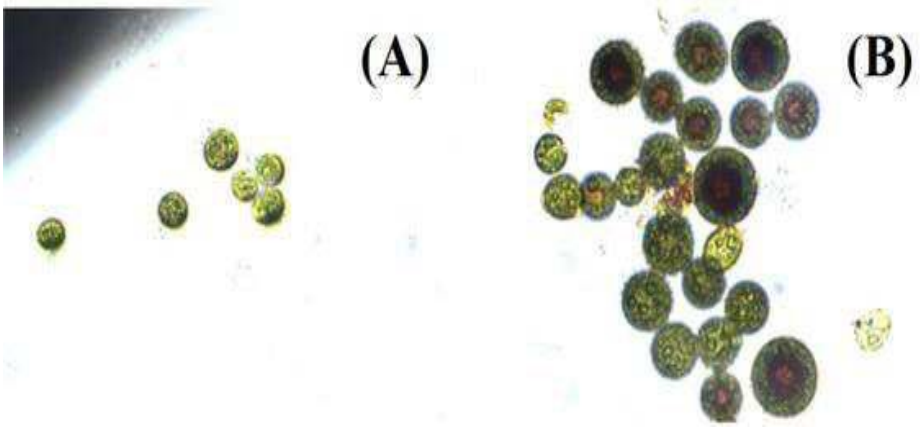
도면1



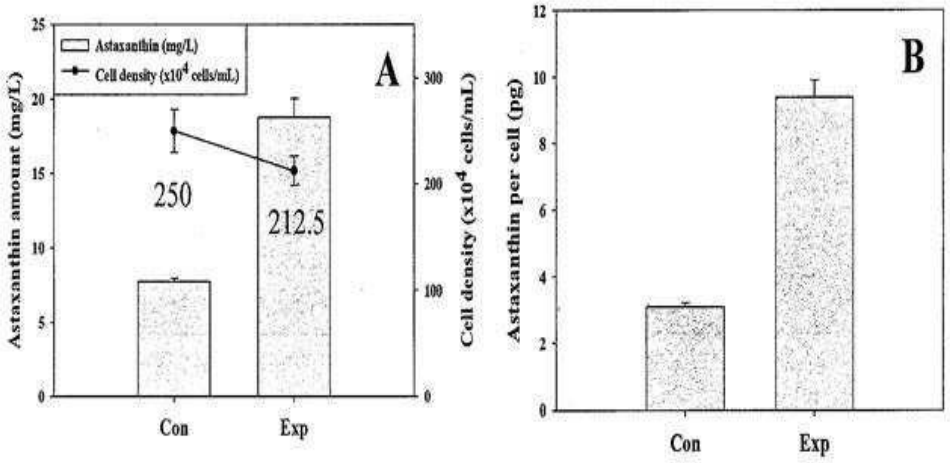
도면2



도면3


(A)
(B)

도면4


Astaxanthin (mg/L)
Cell density (x10^4 cells/mL)
A
250
212.5
Astaxanthin amount (mg/L)
Cell density (x10^4 cells/mL)
Con
Exp
B
Astaxanthin per cell (pg)
Con
Exp