(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2018 년 3 월 8 일 (08.03.2018)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2018/043904 A1

(51) 국제특허분류:
C12M 1/42 (2006.01) *C12N 1/12* (2006.01)
C12P 7/64 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2017/007298

(22) 국제출원일: 2017 년 7 월 7 일 (07.07.2017)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2016-0113417 2016 년 9 월 2 일 (02.09.2016) KR

(71) 출원인: 인하대학교 산학협력단 **(INHA-INDUSTRY PARTNERSHIP INSTITUTE)** [KR/KR]; 22212 인천시 남구 인하로 100, Incheon (KR).

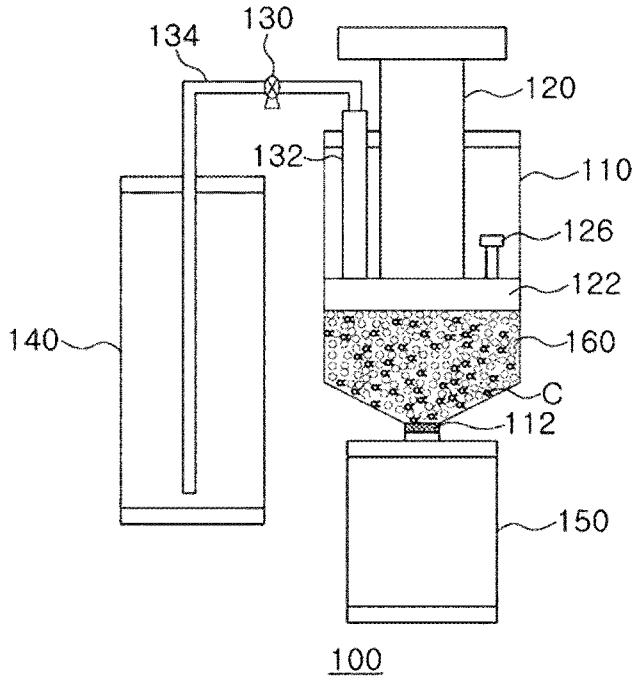
(72) 발명자: 신화성 **(SHIN, Hwa Sung)**; 21968 인천시 연수구 먼우금로 126, 210동 1201호, Incheon (KR). 민슬기 **(MIN, Seul Ki)**; 21064 인천시 계양구 계양문화로 142, 308동 2002호, Incheon (KR). 조명권 **(CHO, Myung Kwon)**; 21334 인천시 부평구 길주로 491, 102동 1001호, Incheon (KR).

(74) 대리인: 김순웅 **(KIM, Soon Woong)**; 08380 서울시 구로구 디지털로 31길 20 (구로동) 601호, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD,

(54) Title: MICROALGAE CELL STIMULATING APPARATUS AND METHOD FOR INCREASING LIPID PRODUCTION OF MICROALGAE USING SAME

(54) 발명의 명칭: 미세조류 세포 자극 장치 및 이를 이용한 미세조류의 지질 생산 증대 방법



(57) Abstract: The present invention relates to a microalgae cell stimulating apparatus and a method for increasing the lipid production of microalgae using the microalgae cell stimulating apparatus. When the microalgae cell stimulating apparatus according to the present invention is used to apply pressure to polyurethane beads in the microalgae cell stimulating apparatus, the restoring force of the polyurethane beads and the contact between adjacent polyurethane beads cause a chain of force dispersion events, thereby continuously applying a mechanical stimulus to the microalgae cells in the apparatus. Therefore, the present invention does not require any other external stimulus and thus is very efficient in view of energy, and does not give any chemical stimulus and thus acts stably on microalgae cells. Especially, the microalgae cell stimulating apparatus of the present invention has an effect of increasing the lipid production of

WO 2018/043904 A1

[다음 쪽 계속]

SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

규칙 4.17에 의한 선언서:

— 신규성을 해치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의 예외에 관한 선언 (규칙 4.17(v))

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

the microalgae cells that have undergone a mechanical stimulus, and thus can be advantageously used in an environmentally friendly biodiesel production method.

(57) 요약서: 본 발명은 미세조류 세포 자극 장치 및 상기 미세조류 세포 자극 장치를 이용한 미세조류의 지질 생산 증대 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 미세조류 세포 자극 장치를 이용하여 상기 미세조류 세포 자극 장치 내 폴리우레탄 비드에 압력을 가하면, 상기 폴리우레탄 비드의 복원력 및 인접한 폴리우레탄 비드 간의 접촉으로 인하여 힘의 분산이 연쇄적으로 발생하여 지속적으로 장치 내 미세조류 세포에 기계적 자극을 가하게 된다. 따라서, 다른 외부 자극을 요구하지 않아 에너지 측면에서 매우 효율적이고, 화학적 자극을 주지 않아 미세조류 세포에 안정적으로 작용한다. 특히, 본 발명의 미세조류 세포 자극 장치로 기계적 자극을 받은 미세조류 세포의 지질 생산이 증대되는 효과가 있어, 친환경 바이오 디젤 생산 방법에 유용하게 이용될 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 미세조류 세포 자극 장치 및 이를 이용한 미세조류의 지질 생산 증대 방법

기술분야

[1] 본 발명은 미세조류 세포 자극 장치 및 상기 미세조류 세포 자극 장치를 이용한 미세조류의 지질 생산 증대 방법에 관한 것이다.

배경기술

[2] 미세조류(microalgae)는 크기가 50 ㎛ 이하의 단세포 조류이다. 자연계의 먹이사슬에서 최하위에 위치하기 때문에 광합성을 통해 유기물을 생산하는 독립영양생물이다. 종에 따라 차이는 있지만 일반적으로 섬유질을 많이 포함하고 있는 세포벽과 다양한 당류를 포함하는 물질로 채워진 내부 추출물로 나눌 수 있다. 일부 종에 함유되어 있는 지질은 식물유와 매우 유사하여 이를 생물연료로 만드는데 매우 적합하며, 상기 지질의 함량이 건조물의 80%까지 이르는 종도 있다. 미세조류는 배양시설 등과 같은 폐쇄된 생산 체계에서 자동으로 대량 배양이 가능하다. 또한, 상기 미세조류의 지질을 수득하기 위하여, 배양 조건 또는 시스템은 매우 중요하다.

[3] 기존의 대용량 기계적 자극(mechanical stress)을 통한 배양시스템에서는 주로 임펠러(impeller)의 스트링(stirring)을 이용한 방식이 이용되어왔다. 또한, 최근에는 압축 로딩 시스템(compressive loading system), 세로길이 신장 시스템(longitudinal stretch system) 및 기질 팽창 시스템(substrate distention system)과 같은 다양한 방식의 대용량 기계적 자극 시스템이 개발되고 있다. 그러나, 스트링의 경우, 유체 자극(fluid stress)을 주기 위한 임펠러 회전 동력 소비가 심해 에너지적 측면에서 비효율적이며, 리액터(reactor) 내부 위치에 따른 자극 정도(임펠러로부터 멀어질수록 자극 강도가 감소)가 다르기 때문에, 공간적으로 일정한 스트레스를 주지 못한다는 한계점을 갖고 있다. 또한, 세로길이 신장 시스템 또는 기질 팽창 시스템의 경우, 부착세포에만 적용된다는 한계점을 갖고 있으며, 2차원적인 면적단위 자극 방식이므로, 많은 양의 세포에 자극을 주기 위해서 공간적 소비가 심하다는 공간적 비효율성을 가지고 있다.

[4] 상기와 같은 문제를 해결하기 위하여, 본 발명자들은 기계적 자극을 이용하는 배양 시스템을 이용하여 미세조류의 지질 생산을 증대시키는 방법을 연구하던 중, 폴리우레탄 비드를 이용하여 미세조류에 기계적 자극을 주는 미세조류 세포 자극 장치를 제작하였다. 상기 장치에 의해 탄성체 고분자 비드에 압력이 가해지고 압축된 탄성체 고분자 비드가 복원되면서 미세조류의 세포에 기계적 자극을 주게 되면, 미세조류의 지질 생산량이 증가됨을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

[5]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[6] 본 발명의 목적은 미세조류 세포 자극 장치를 제공하는 것이다.

[7] 또한 본 발명의 목적은 미세조류의 지질 생산 증대 방법을 제공하는 것이다.

[8] 또한 본 발명의 목적은 지질 생산이 증대된 미세조류의 제조 방법을 제공하는 것이다.

[9] 또한 본 발명의 목적은 상기 제조 방법으로 지질 생산이 증대된 미세조류를 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

[10] 상기와 같은 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 일측에 출구가 형성되고, 상기 출구를 개폐 가능하도록 형성된 필터를 구비하는 자극반응 탱크; 측면이 상기 자극반응 탱크의 내주면에 접하여 상기 자극반응 탱크 내부에서 승강 운동하는 자극기 헤드를 구비하는 자극기; 상기 자극반응 탱크 내부로 용액을 주입하거나, 상기 자극반응 탱크 내부의 용액을 흡입하여 배출시키는 펌프; 및 상기 자극반응 탱크 내부에 수용되는 탄성체 고분자 비드를 포함하고, 상기 자극기 헤드에는 상기 용액이 투과되는 노즐이 구비되는 것을 특징으로 하는 미세조류 세포 자극 장치를 제공한다.

[11] 또한 본 발명은, (a) 상기 미세조류 세포 자극 장치의 자극기를 이용하여 탄성체 고분자 비드를 압축하는 단계; (b) 상기 미세조류 세포 자극 장치의 주입구에 미세조류의 세포를 주입하는 단계; (c) 상기 미세조류 세포 자극 장치의 자극기를 상승 작용시킨 후 탄성체 고분자 비드가 복원되면서 미세조류 세포에 기계적 자극을 주는 단계; 및 (d) 상기 미세조류 세포 자극 장치의 필터를 개방하고 자극기를 하강 작용시킨 후 회수 탱크에 상기 미세조류 세포를 회수하는 단계;를 포함하는 미세조류의 지질 생산 증대 방법을 제공한다.

[12] 또한 본 발명은, (a) 상기 미세조류 세포 자극 장치의 자극기를 이용하여 탄성체 고분자 비드를 압축하는 단계; (b) 상기 미세조류 세포 자극 장치의 주입구에 미세조류의 세포를 주입하는 단계; (c) 상기 미세조류 세포 자극 장치의 자극기를 상승 작용시킨 후 탄성체 고분자 비드가 복원되면서 미세조류 세포에 기계적 자극을 주는 단계; 및 (d) 상기 미세조류 세포 자극 장치의 필터를 개방하고 자극기를 하강 작용시킨 후 회수 탱크에 상기 미세조류 세포를 회수하는 단계;를 포함하는 지질 생산이 증대된 미세조류의 제조 방법을 제공한다.

[13] 또한 본 발명은, 상기 제조 방법으로 지질 생산이 증대된 미세조류를 제공한다.

[14]

발명의 효과

[15] 본 발명에 따른 미세조류 세포 자극 장치를 이용하여 상기 미세조류 세포 자극 장치 내 탄성체 고분자 비드에 압력을 가하면, 상기 탄성체 고분자 비드의 복원력 및 인접한 탄성체 고분자 비드 간의 접촉으로 인하여 힘의 분산이

연쇄적으로 발생하여 지속적으로 장치 내 미세조류 세포에 기계적 자극을 가하게 된다. 따라서, 본 발명에 따른 미세조류 세포자극 장치는 다른 외부 자극을 요구하지 않아 에너지 측면에서 매우 효율적이고, 화학적 자극을 주지 않아 미세조류 세포에 안정적으로 작용할 수 있는 장점이 있다. 특히, 본 발명의 미세조류 세포 자극 장치로 기계적 자극을 받은 미세조류 세포의 지질 생산이 증대되는 효과가 있어, 친환경 바이오 디젤 생산 방법에 유용하게 이용될 수 있다.

[16]

도면의 간단한 설명

[17] 도 1은 본 발명의 바람직한 실시예에 따른 세포 자극 장치의 개략도이다.

[18] 도 2의 a는 자극된 클라미도모나스 라인하르티의 지질 생산 증대 과정을 모식화한 도이다. 도 2의 b는 본 발명의 세포 자극 장치의 압축 단계, 탈-압축 단계 및 회수 단계를 모식화한 도이다.

[19] 도 3의 a는 폴리우레탄 함량(%)(w/v)에 따른 폴리우레탄 비드의 형태를 나타낸 도이다. 도 3의 b는 각 폴리우레탄 함량(%)(w/v)에 따른 비드의 지름을 나타낸 도이다. 도 3의 c는 30% (w/v) 폴리우레탄 비드의 표면 및 단면적 형태를 나타낸 도이다.

[20] 도 4의 a는 자극 횟수에 따른 폴리우레탄 비드의 복원력 정도를 확인한 도이다. 도 4의 b는 클라미도모나스 라인하르티를 자극한 비드의 내부에 세포가 침투했는지 확인하기 위하여 비드 내부 액체의 흡광도를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

[21] 도 5의 a 및 b는 대조군 및 자극된 클라미도모나스 라인하르티의 칼슘 유입을 확인한 도이다. 도 5의 c는 자극 12시간 및 24시간의 클라미도모나스 라인하르티의 세포 크기를 확인한 도이다. 도 5의 d는 대조군 및 자극된 클라미도모나스 라인하르티의 Mat3 및 E2F1의 mRNAs 발현 정도를 확인한 도이다.

[22] 도 6의 a 및 b는 자극 시간 및 압력 정도에 따른 클라미도모나스 라인하르티의 지방 소립의 증가를 확인한 도이다.

[23] 도 7의 a는 자극 시간에 따른 단세포의 세포 내 지질량을 확인한 도이다. 도 7의 b는 총세포의 지질 소립 합성 정도를 나타낸 도이다(블랙 바는 대조군, 회색 바는 자극된 세포를 의미함).

[24] 도 8은 대조군 및 자극된 클라미도모나스 라인하르티의 지질 함량을 분석한 결과를 나타낸 도이다.

[25] 도 9는 대조군과 비교하여 각 시간 조건에 따른 압축 및 탈-압축된 클라미도모나스 라인하르티의 ACCase, DGAT 및 LPAAT의 mRNA 발현 정도를 확인한 도이다.

[26] 도 10의 a는 클라미도모나스 라인하르티 세포의 직접적 자극 조건을 모식화한

도이다. 도 10의 b는 직접적 자극에 따른 세포의 모습을 나타낸 도이다.

[27] 도 11은 대조군과 비교하여 각 시간 조건에 따른 압축 과정 및 탈-압축된 클라미도모나스 라인하르티의 세포사멸률(%)을 나타낸 도이다.

[28]

발명의 실시를 위한 형태

[29] 일 양태로서, 본 발명은 일측에 출구가 형성되고, 상기 출구를 개폐 가능하도록 형성된 필터를 구비하는 자극반응 탱크; 측면이 상기 자극반응 탱크의 내주면에 접하여 상기 자극반응 탱크 내부에서 승강 운동하는 자극기 헤드를 구비하는 자극기; 상기 자극반응 탱크 내부로 용액을 주입하거나, 상기 자극반응 탱크 내부의 용액을 흡입하여 배출시키는 펌프; 및 상기 자극반응 탱크 내부에 수용되는 탄성체 고분자 비드를 포함하고, 상기 자극기 헤드에는 상기 용액이 투과되는 노즐이 연결되는 것을 특징으로 하는 미세조류 세포 자극 장치를 제공한다.

[30] 도 1은 본 발명의 바람직한 실시예에 따른 세포 자극 장치의 개략도이다.

[31] 도 1을 참고하여, 본 발명의 바람직한 실시예에 따른 미세조류 세포 자극 장치(100)를 설명한다.

[32] 본 발명의 바람직한 실시예에 따른 미세조류 세포 자극 장치(100)는 자극반응 탱크(110), 자극기(120), 펌프(130), 공급 탱크(140), 회수 탱크(150) 및 탄성체 고분자 비드(160)를 포함한다.

[33] 자극반응 탱크(110)는 일측에 출구가 형성되고, 상기 출구를 개폐 가능하도록 형성된 필터(112)를 구비한다. 이러한 자극반응 탱크(110)는 원통형 등의 직선형 관 모양으로 형성된다.

[34] 필터(112)는 자극반응 탱크(110)의 출구에 배치되어 자극기(120)에 의해 상부가 폐쇄된 자극반응 탱크(110)의 내부를 개폐시키는 역할을 한다. 이러한 필터(112)는 스테인리스 스틸 멤브레인 필터로 구현될 수 있으며, 필터(112)의 공극 크기는 800㎛~1200㎛로 형성하여 자극반응 탱크(110) 내부에 수용되는 탄성체 고분자 비드(160)를 걸러낼 수 있도록 한다.

[35] 자극기(120)는 일단에 측면이 자극반응 탱크(110)의 내주면에 접하여 자극반응 탱크(110) 내부에서 승강운동하는 자극기 헤드(122)를 구비한다.

[36] 자극기 헤드(122)에는 미세조류 세포(C)의 배양을 위한 배양액 등의 용액이 투과되어 필터역할을 수행하는 노즐(132)이 연결되는데, 노즐(132)의 공극 크기는 3㎛~10㎛로 형성하여 펌프(130)를 이용한 용액의 배출 시 배출되는 용액과 함께 미세조류 세포(C)가 자극반응 탱크(110)의 외부로 누출되는 것을 방지한다.

[37] 또한, 자극기 헤드(122)에는 자극반응 탱크(110)와 자극기 헤드(122)에 의해 둘러 싸여진 자극반응 탱크(110)의 내부공간에 미세조류 세포(C)를 주입하여 접종시키기 위한 주입구(126)가 구비된다.

[38] 펌프(130)는 자극반응 탱크(110) 내부로 배양액 등의 용액을 주입하거나, 자극반응 탱크(110) 내부의 용액을 흡입하여 공급 탱크(140)로 배출시킨다.

[39] 이때, 펌프(130)에는 내부로 용액이 흐를 수 있도록 형성되는 관(134)이 연결되고, 자극반응 탱크(110)를 향하는 관(134)의 일단에는 노즐(132)이 결합된다.

[40] 이때, 노즐(132)은 관(134)에 결합되지 않은 타측이 자극기 헤드(122)가 상승된 상태에서 자극기 헤드(122)에 연결되도록 구비된다.

[41] 공급 탱크(140)는 펌프(130)에 의해 자극반응 탱크(110)로부터 배출되거나, 자극반응 탱크(110)로 공급되는 용액이 저장된다.

[42] 회수 탱크(150)는 필터(112)가 개방된 상태에서 용액과 함께 필터(112)를 투과하여 배출된 미세조류 세포(C)가 수용되는 부분이다.

[43] 탄성체 고분자 비드(160)는 탄성을 가지는 재질로 형성되고, 자극반응 탱크(110) 내부에 수용되어 자극기 헤드(122)에 의해 압력을 받아 변형되면서 함께 자극반응 탱크(110)에 수용된 미세조류 세포(C)에 물리적 자극을 가하는 역할을 한다.

[44] 상기 탄성체 고분자(elastomeric polymer) 비드는 탄성을 갖는 소재를 이용하여 제조될 수 있으며, 바람직하게는 다공성을 갖는 다공성 탄성체 고분자인 마이크로 비드일 수 있다. 다공성 탄성체 고분자를 이용하는 경우 다공성 구조에 media가 함유되고 이를 압축하는 경우 내재적 탄성 성질에 의해 media가 방출되어 세포의 사멸을 저해할 수 있는 효과가 있다. 본 발명에 사용 가능한 탄성 소재는 당분야에 알려진 탄성소재로부터 제한 없이 선택될 수 있으며, 나일론 스펀지, 폴리우레탄, 다공성 합성수지, 고무류, 실리콘류에서 선택될 수 있다. 다공성 탄성체 고분자는 탄성을 갖는 생분해성 고분자일 수 있으며, 폴리(L-락트산-co-ε-카프로락톤)(Poly(L-lactide-co-ε-caprolactone)), 폴리락트산(PLA), 폴리글리콜산(PGA), 폴리(D,L-락트산-co-글리콜산)(poly(D,L-lactide-coglycolide);PLGA), 폴리(카프로락톤), 디올/디애시드계 지방족 폴리에스테르, 폴리에스테르-아미드/폴리에스테르-우레탄, 폴리우레탄, 폴리에틸렌옥사이드(Polyethylene oxide), 폴리(발레로락톤), 폴리(하이드록시부티레이트) 및 폴리(하이드록시 발러레이트)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 합성 고분자, 또는 키토산, 키틴, 알긴산, 콜라겐, 젤라틴 및 히알루론산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 천연 고분자 중 어느 하나 이상의 고분자를 이용하여 제조될 수 있다. 본 발명의 바람직한 일 구현예에서는 폴리우레탄을 다공성을 갖는 탄성소재로 이용한 예를 개시한다.

[45] 본 발명에서 용어 "폴리우레탄"은 알코올기와 아이소사이안산기의 결합으로 만들어진 우레탄결합으로 결합된 고분자 화합물의 총칭이다. 폴리우레탄은 거품 구조를 가지기 때문에 탄성이 있고 견고하며 가벼운 특성을 가진다. 또한,

화학약품에 잘 견디는 특성을 가지고 있으며, 신축성이 좋아 고무의 대체 물질로도 사용된다.

[46] 본 발명의 바람직한 일 구현예에서 폴리우레탄 비드는 폴리우레탄을 10 내지 50%(w/v) 농도로 포함할 수 있고, 더욱 바람직하게는 25 내지 30%(w/v) 농도의 폴리우레탄을 포함하는 비드이다.

[47] 도 2는 본 발명의 바람직한 실시예에 따른 세포 자극 장치를 이용하여 세포에 자극을 가하는 과정을 설명하기 위한 도면이다.

[48] 이하, 도 2를 참고하여 상술한 본 발명의 세포 자극 장치(100)를 이용하여 세포에 물리적 자극을 가하는 과정을 설명한다.

[49] 먼저, 도 2의 ①과 같이, 자극반응 탱크(110) 내부에 다수의 탄성체 고분자 비드(160)와 배양액 등의 용액을 채우고, 필터(112)는 폐쇄 상태(OFF)가 되도록 하여 자극반응 탱크(110) 내부의 충진물들이 외부로 누출되지 않도록 한다.

[50] 이후, 도 2의 ②와 같이, 필터(112)의 폐쇄 상태(OFF)가 유지된 상태에서, 자극기(120)를 하강시켜 탄성체 고분자 비드(160)를 압축 시키고, 자극반응 탱크(110) 내부의 용액은 노즐(132)을 통해 자극기 헤드(122)의 상부공간으로 배출되어 공급 탱크(140)에 이동된다.

[51] 이후, 도 2의 ③와 같이, 필터(112)의 폐쇄 상태(OFF)가 유지된 상태에서, 주입구(126)에 미세조류 세포(C)를 주입한다.

[52] 이후, 도 2의 ④와 같이, 필터(112)의 폐쇄 상태(OFF)가 유지된 상태에서, 자극기(120)를 상승시켜 탄성체 고분자 비드(160)의 복원력 및 탄성력을 이용하여 미세조류 세포(C)에 기계적 자극이 가하도록 한다. 이때, 공급 탱크(140)의 용액이 펌프(130)를 이용하여 자극반응 탱크(110)으로 이동한다.

[53] 이후, 도 2의 ⑤와 같이, 필터(112)의 개방 상태(ON)가 유지된 상태에서, 기계적 자극이 가해진 미세조류 세포(C)가 회수 탱크(150)로 유입되도록 하고, 탄성체 고분자 비드(160)들은 필터(112)에 의해 걸러져서 자극반응 탱크(110) 내부에 잔류하게 된다.

[54]

[55] 또한 본 발명은, (a) 상기 미세조류 세포 자극 장치의 자극기를 이용하여 탄성체 고분자 비드를 압축하는 단계; (b) 상기 미세조류 세포 자극 장치의 주입구에 미세조류의 세포를 주입하는 단계; (c) 상기 미세조류 세포 자극 장치의 자극기를 상승 작용시킨 후 탄성체 고분자 비드가 복원되면서 미세조류 세포에 기계적 자극을 주는 단계; 및 (d) 상기 미세조류 세포 자극 장치의 필터를 개방하고 자극기를 하강 작용시킨 후 회수 탱크에 상기 미세조류 세포를 회수하는 단계;를 포함하는 미세조류의 지질 생산 증대 방법을 제공한다.

[56] 상기 미세조류의 지질 생산 증대 방법은 도 2를 참고하여 상술한 본 발명의 세포 자극 장치(100)의 자극기를 이용하여 세포에 물리적 자극을 가하는 과정을 포함하는 것으로, 과도한 기재 및 중복 제거를 위하여 추가적인 설명은 생략한다.

[57] 본 발명에서 용어 "기계적 자극"은 기계나 기구 따위를 사용하여 생물체에 작용함으로써 어떤 반응을 일으키게 하는 일을 의미하며, 예컨대, 본 발명에서는 압축된 탄성체 고분자가 복원되어 세포에 가하는 자극을 의미한다.

[58] 상기 (a)의 압축은 1 내지 48시간 가하는 것이나, 바람직하게는 1 내지 30시간, 더욱 바람직하게는 4 내지 24시간이며, 이에 제한되지 않는다.

[59]

[60] 본 발명의 미세조류는 기계적인 자극을 통해 대사에 변화가 유도될 수 있는 다양한 미세조류를 제한 없이 포함할 수 있으며, 구체적으로 본 발명의 자극 장치를 이용 시, 압축 단계, 탈-압축 단계 및 회수 단계를 거쳐 기계적 자극을 받는 경우 멤브레인 왜곡(membrane distortion)이 유도되어 칼슘 유입이 비 자극된 세포보다 증가될 수 있는 미세조류일 수 있다. 예컨대 상기 미세조류는 클라미도모나스 라인하르티(*Chlamydomonas* reinhardtii), 클라미도모나스 카다타(*Chlamydomonas* caudate), 클라미도모나스 모에우시(Chlamydomonas moewusii), 클라미도모나스 니바리스(*Chlamydomonas* nivalis), 클라미도모나스 오보이대(Chlamydomonas ovoidae), 아나시스티스 니둘란스(*Anacystis* nidulans), 안키스트로데스무스(*Ankistrodesmus* sp.), 비둘파 아우리타(*Biddulpha* aurita), 보트리오코쿠스 브라우니(*Botryococcus* braunii), 키토세라스(Chaetoceros sp.), 클라미도모나스 아플란타(*Chlamydomonas* applanata), 클로렐라(*Chlorella* sp.), 클로렐라 엘립소이데아(*Chlorella* ellipsoidea), 클로렐라 에멀소니(*Chlorella* emersonii), 클로렐라 프로토세코이드(*Chlorella* protothecoides), 클로렐라 피레노이도사(*Chlorella* pyrenoidosa), 클로렐라 소로키니아나(*Chlorella* sorokiniana), 클로렐라 불가리스(*Chlorella* vulgaris), 클로렐라 미누티시마(*Chlorella* minutissima), 클로로코쿠 리토레일(*Chlorococcu* littorale), 시클로텔라 크립티카(Cyclotella cryptica), 두날리엘라 바르다윌(*Dunaliella* bardawil), 두날리엘라 살리나(*Dunaliella* salina), 두날리엘라 테르티오렉타(*Dunaliella* tertiolecta), 두날리엘라 프리모렉타(*Dunaliella* primolecta), 짐노디움(*Gymnodinum* sp.), 헤머노모나스 카테라에(*Hymenomonas* carterae), 이소크리시스 갈베나(*Isochrysis* galbana), 이소크리시스(*Isochrysis* sp.), 마이크로시스티스 아에루기노사(*Microcystis* aeruginosa), 마이크로모나스 푸실라(Micromonas pusilla), 모노두스 서브테라네우스(*Monodus* subterraneous), 나노클로리스(*Nannochloris* sp.), 나노클로롭시스(*Nannochloropsis* sp.), 나노클로롭시스 아토무스(*Nannochloropsis* atomus), 나노클로롭시스 살리나(*Nannochloropsis* salina), 나비큘라 필리큘로사(*Navicula* pelliculosa), 니츠시아(*Nitzschia* sp.), 니츠시아 클로스테리움(*Nitzscia* closterium), 니츠시아 팔레아(*Nitzscia* palea), 오시스티스 폴리모피아(*Oocystis* polymorpha), 아우로코커스(*Aurococcus* sp.), 오실라토리아 루베스켄스(*Oscillatoria* rubescens), 파브로바 루테리(*Pavlova* lutheri), 패오닥트리움 트리코누툼(*Phaeodactylum* tricornutum), 피크노코커스 프로바솔리(*Pycnococcus* provasolii), 피라미노나스 코르다타(*Pyramimonas* cordata

), 스피눌라 플라텐시스(*Spirulina* platensis), 스테파노디스커스 미누투루스(*Stephanodiscus* minutulus), 스티코커스(*Stichococcus* sp.), 시네드라우르나(*Synedra* ulna), 스케네데스무스 오브리쿼스(*Scenedesmus* obliquus), 스켈레나스트럼 그라시레(*Selenastrum* gracile), 스켈레토노마 코스타럼(*Skeletonoma* costalum), 테트라셀미스 출리(*Tetraselmis* chui), 테트라셀미스 마쿠라타(*Tetraselmis* maculata), 테트라셀미스(*Tetraselmis* sp.), 테트라셀미스 수에시카(*Tetraselmis* suecica), 탈라시오스트라 프세우도모나(*Thalassiostra* pseudomona), 아나배나(*Anabaena* sp.), 칼로드릭스(*Calothrix* sp.), 카마에시폰(*Chaemisiphon* sp.), 코로코시디옵시스(*Chroococcidiopsis* sp.), 차노데세(*Cyanothece* sp.), 실린더로스페멈(*Cylindrospermum* sp.), 데모카펠라(*Dermocarpella* sp.), 피셔렐라(*Fischerella* sp.), 글로에오캅사(*Gloeocapsa* sp.), 믹소사시나(*Myxosarcina* sp.), 노스톡(*Nostoc* sp.), 오스실라토리아(*Oscillatoria* sp.), 포르미디움 코리움(*Phormidium corium*), 플레우로캅사(*Pleurocapsa* sp.), 프로콜로코코스(*Prochlorococcus* sp.), 페세우다나바에나(*Pseudanabaena* sp.), 시네코코스(*Synechococcus*), 시네코시스티스(*Synechocystis* sp.), 톨리포트릭스(*Tolypothrix* sp.) 및 제노코코스(*Xenococcus sp.*)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으며, 바람직하게는 클라미도모나스 속(*Chlamydomonas* sp.)일 수 있고, 본 발명의 일 구현예에서는 클라미도모나스 라인하르티(*Chlamydomonas* reinhardtii)를 이용한 실험예를 개시하였으나, 이에 제한되지 않는다.

[61] 상기 미세조류는 바다, 하천, 또는 호수 등에서 포집된 것을 배양하지 않고 포집된 그대로 회수할 수도 있으며, 광생물 배양기 등을 이용하여 배양된 미세조류일 수 있다.

[62] 상기 지질은 포화 또는 불포화 지방산일 수 있고, C14, C16, C18, C20, C21, C24, C27, C28 및 C29으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 사슬 길이를 갖는 지방산이며, 이에 제한되지 않는다.

[63]

[64] 또한 본 발명은, (a) 상기 미세조류 세포 자극 장치의 자극기를 이용하여 탄성체 고분자 비드를 압축하는 단계; (b) 상기 미세조류 세포 자극 장치의 주입구에 미세조류의 세포를 주입하는 단계; (c) 상기 미세조류 세포 자극 장치의 자극기를 상승 작용시킨 후 탄성체 고분자 비드가 복원되면서 미세조류 세포에 기계적 자극을 주는 단계; 및 (d) 상기 미세조류 세포 자극 장치의 필터를 개방하고 자극기를 하강 작용시킨 후 회수 탱크에 상기 미세조류 세포를 회수하는 단계;를 포함하는 미세조류의 지질 생산 증대 방법을 제공한다.

[65] 또한 본 발명은, (a) 상기 미세조류 세포 자극 장치의 자극기를 이용하여 탄성체 고분자 비드를 압축하는 단계; (b) 상기 미세조류 세포 자극 장치의 주입구에 미세조류의 세포를 주입하는 단계; (c) 상기 미세조류 세포 자극 장치의 자극기를 상승 작용시킨 후 탄성체 고분자 비드가 복원되면서 미세조류 세포에 기계적 자극을 주는 단계; 및 (d) 상기 미세조류 세포 자극 장치의 필터를 개방하고

자극기를 하강 작용시킨 후 회수 탱크에 상기 미세조류 세포를 회수하는 단계;를 포함하는 지질 생산이 증대된 미세조류의 제조 방법을 제공한다.

[66] 상기 미세조류는 비편모조류화(deflagellation)될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[67] 본 발명에 있어서, "비편모조류화(deflagellation)"는 미세조류에 운동성을 갖게 하는 편모가 존재하는데, 해당 편모가 떨어져 나가는 현상을 의미한다.

[68] 또한 본 발명은, 상기 제조 방법으로 지질 생산이 증대된 미세조류를 제공한다.

[69]

[70] 본 발명의 일실시예에 있어서, 본 발명의 자극 장치를 이용 시, 압축 단계, 탈-압축 단계 및 회수 단계를 거쳐 클라미도모나스 라인하르티 세포에 기계적 자극을 효과적으로 가하게 됨을 확인하였다. 또한, 상기 자극 장치 내 30%(w/v) 폴리우레탄 비드를 이용 시, 상기 비드는 우수한 탄성력, 복원력 및 강인성이 존재하여 효과적으로 세포에 자극을 가하고, 자극 시간은 1 내지 24시간 자극이 최적임을 확인하였다.

[71] 상기 일련의 실험을 통하여, 본 발명의 자극 장치를 이용 시, 압축 단계, 탈-압축 단계 및 회수 단계를 거쳐 클라미도모나스 라인하르티 세포에 기계적 자극을 효과적으로 가하게 됨을 확인하였다. 또한, 상기 자극 장치 내 30%(w/v) 폴리우레탄 비드를 이용 시, 상기 비드는 우수한 탄성력, 복원력 및 강인성이 존재하여 효과적으로 세포에 자극을 가하고, 자극 시간은 1 내지 24시간 자극이 최적임을 확인하였다.

[72] 또한, 본 발명의 자극 장치를 이용하여 자극된 클라미도모나스 라인하르티 세포는 멤브레인 왜곡(membrane distortion)이 유도되어 칼슘 유입이 대조군 세포보다 증가되어 비편모조류화(deflagellation) 됨을 확인하였다. 또한, 생리적 변화와 관련된 Mat3 mRNAs 발현이 증가되어, 생리적 변화가 발생됨을 확인하였고, 자극 되지 않은 대조군과 비교하여 세포의 크기가 더 커짐을 확인하였다. 또한, 지질 관련된 ACCase, DGAT 및 LPAAT의 mRNA 발현이 증가되고, 자극된 클라미도모나스 라인하르티는 C14, C16, C18, C20, C21, C24, C27, C28 및 C29의 사슬 길이를 갖는 지방산을 함유하고, 대조군과 비교하여 다가불포화지방산(Polyunsaturated fatty acid, PUFA)이 발생하는 것을 확인하였고, 이에 따라, 압축 스트레스에 의해 클라미도모나스 라인하르티 세포 내에 지질 구성이 변화하는 것을 확인하였다.

[73] 따라서, 본 발명에 따른 미세조류 세포자극 장치를 이용시, 다른 외부 자극을 요구하지 않아 에너지 측면에서 매우 효율적이고, 화학적 자극을 주지 않아 미세조류 세포에 안정적으로 작용할 수 있는 장점이 있다. 특히, 본 발명의 미세조류 세포 자극 장치로 기계적 자극을 받은 미세조류 세포의 지질 생산이 증대되는 효과가 있어, 친환경 바이오 디젤 생산 방법에 유용하게 이용될 수 있다.

[74]

[75] 이하, 실시예를 통해 본 발명을 자세히 설명하도록 한다. 하기 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[76]

[77] **실험예 1. 미세조류 세포 자극 장치 제조 및 실험 방법**

[78]

[79] **1-1. 미세조류 세포 자극 장치 제조**

[80] 본 발명의 미세조류 세포 자극 장치(100)는 도 1에 나타내었으며, 일반적으로 자극반응 탱크와 같이 세포에 자극을 가하는 펌핑 원리를 이용하였으며, 구체적으로, 자극기(120), 펌프(130), 공급 탱크(140), 회수 탱크(150) 및 탄성체 고분자 비드(160)를 포함하도록 제작하였다. 보다 구체적으로, 자극반응 탱크(110)는 일측에 출구가 형성되고, 상기 출구를 개폐 가능하도록 형성된 필터(112)를 구비하였다. 상기 자극반응 탱크(110)는 원통형 등의 직선형 관 모양으로 형성하도록 하였다. 필터(112)는 자극반응 탱크(110)의 출구에 배치되어 자극기(120)에 의해 상부가 폐쇄된 자극반응 탱크(110)의 내부를 개폐시키는 역할을 하도록 하였다. 상기 필터(112)는 스테인리스 스틸 멤브레인 필터로 구현될 수 있으며, 필터(112)의 공극 크기는 800㎛~1200㎛로 형성하여 자극반응 탱크(110) 내부에 수용되는 탄성체 고분자 비드(160)를 걸러낼 수 있도록 제작하였다.

[81] 또한, 자극기(120)는 일단에 측면이 자극반응 탱크(110)의 내주면에 접하여 자극반응 탱크(110) 내부에서 승강 운동하는 자극기 헤드(122)를 구비하도록 하고, 상기 자극기 헤드(122)에는 배양액 등의 용액이 투과되어 필터역할을 수행하는 노즐(132)이 연결되는데, 노즐(132)의 공극 크기는 3㎛~10㎛로 형성하여 펌프(130)를 이용한 용액의 배출 시 배출되는 용액과 함께 미세조류 세포(C)가 자극반응 탱크(110)의 외부로 누출되는 것을 방지하게 제작하였다. 또한, 자극기 헤드(122)에는 자극반응 탱크(110)와 자극기 헤드(122)에 의해 둘러싸여진 자극반응 탱크(110)의 내부공간에 세포(C)를 주입하여 접종시키기 위한 주입구(126)를 구비하도록 제작하였다.

[82] 또한, 펌프(130)는 자극반응 탱크(110) 내부로 배양액 등의 용액을 주입하거나, 자극반응 탱크(110) 내부의 용액을 흡입하여 공급 탱크(140)로 배출시키게 하는 양방향 펌프이다. 이때, 상기 펌프(130)에는 내부로 용액이 흐를 수 있도록 형성되는 관(134)이 연결되고, 자극반응 탱크(110)를 향하는 관(134)의 일단에는 노즐(132)이 결합된다. 또한, 상기 노즐(132)은 관(134)에 결합되지 않은 타측이 자극기 헤드(122)가 상승된 상태에서 자극기 헤드(122)에 연결되도록 제작하였다.

[83] 또한, 공급 탱크(140)는 펌프(130)에 의해 자극반응 탱크(110)로부터 배출되거나, 자극반응 탱크(110)로 공급되는 용액이 저장되도록 제작하였다.

[84] 또한, 회수 탱크(150)는 필터(112)가 개방된 상태에서 용액과 함께 필터(112)를 투과하여 배출된 미세조류 세포(C)가 수용되는 부분이다.

[85] 또한, 탄성체 고분자 비드(160)는 30% (w/v) 농도의 탄성체 고분자 비드를 이용하여, 자극반응 탱크(110) 내부에 수용되어 자극기 헤드(122)에 의해 압력을 받아 변형되면서 함께 자극반응 탱크(110)에 수용된 미세조류 세포(C)에 물리적 자극을 가하는 역할을 하도록 제작하였다.

[86] 상기 미세조류 세포 자극 장치를 이용하여, 클리미도모나스 라인하르티 세포에 자극을 가하는 과정은 도 2에 나타내었다. 구체적으로, 자극반응 탱크(110) 내부에는 30% (w/v) 농도의 제형된 탄성체 고분자 비드(160)로 가득 채워져 있으며, 도 2의 과정을 따라서 압축, 탈-압축 및 회수 단계를 진행하였다.

[87] 상기 압축 단계의 경우, 자극기(120)에 압력을 가하여 자극반응 탱크(110) 내부를 압축하는 동시에 노즐(132)을 통해 일정량의 배지를 배출시켰다. 탄성체 고분자 비드(160)가 완전히 압축된 후에, 주입구(126)를 통해 세포(C)가 주입된다. 상기 과정에서, 배지 배출과 함께 세포 손실이 발생할 가능성이 있기 때문에 반드시 비드 압축이 완전히 끝난 이후에 세포 주입을 진행하였다. 또한, 상기 과정에서, 압축에 의해 세포가 회수 탱크(150)로 빠져나가지 않도록 하단부의 1000 ㎛의 필터(112)를 off 상태로 두었다. 이때, 30% (w/v) 농도의 탄성체 고분자 비드(160)는 압축되어 있는 상태이며, 원래의 모양을 복원하려는 힘으로 인해 지속적으로 주변 세포에 기계적 자극을 가하게 된다. 또한, 비드간의 접촉으로 인한 힘의 분산이 발생한다. 이러한 힘의 분산이 연쇄적으로 일어나면서 전체 비드가 동일하게 압축되며, 결과적으로 공간적으로 일정한 기계적 자극을 전체 세포에 가하게 된다.

[88] 탈-압축 단계의 경우, 자극기(120)를 승강하면서, 펌프(130)를 통해 공급 탱크(140) 내의 배지를 추가적으로 자극반응 탱크(110)에 주입하였다. 이때, 상기 압축된 30% (w/v) 농도의 탄성체 고분자 비드(160)는 복원력으로 인하여, 다시 전체 세포(C)에 기계적 자극을 가하게 된다.

[89] 회수 단계의 경우, 상기 탈-압축에 의하여 충분히 공간이 확보된 상태에서 공급된 배지에 의해 뭉친 탄성체 고분자 비드(160)가 복원되어 완전히 풀린 뒤 하단부의 off 상태였던 필터(112)를 on 시키고, 상단부의 노즐(132)을 막은 상태에서 자극기(120)에 압력을 가하여 회수 탱크(150)를 통해 세포(C)를 회수하였다.

[90]

[91] **1-2. 폴리우레탄** 비드(Polyurethane beed) 제작

[92] 폴리우레탄(Polyurethane, PU)은 탄성체 고분자(elastomeric polymer)로서 비드의 재료로 사용하였다. 폴리우레탄 템플릿을 N,N-dimethylformamide (DMF)에 녹여 30%(w/v) 폴리우레탄 용액을 만든 후, 밤새 완전히 녹이고 플라스틱 시린지에 로딩하여 22G 니들(needle)과 연결하였다. 상기 시린지 세트를 시린지 펌프(KD Scientific)에 설치하고 유량을 3 ml/h로 설정하였다. 상기

시린지에서 구 형태로 떨어진 폴리우레탄 비드는 비커에 담겨 있는 2차 증류수에 모았으며, syringe 끝으로부터 증류수까지의 낙하 높이는 9 cm로 유지하여, 폴리우레탄이 20% (w/v), 25% (w/v), 30% (w/v), 35% (w/v) 및 40% (w/v)로 함유된 폴리우레탄 비드를 제형하였다. 상기 제형된 폴리우레탄 비드 내부의 잔여 DMF를 제거하기 위하여 95% 에탄올(Samshun pure chemical)에 밤새 담가두었다. 이후 2차 증류수로 3회 세척하였으며, 최종적으로 비드를 TAP배지에 밤새 동안 담가었다. 상기 과정에서 비드에 압력을 가하여 내부에 흡수된 용액까지 배출시키며 세척하였고, 비드의 탄성력을 높이고 일정 압력에 대한 복원력을 갖도록 하였다.

[93] 상기 제형된 폴리우레탄 비드의 형태를 관찰하기 위하여 SEM(Scanning electron microscope)(Hitachi S-4200)을 이용하였다. 데시케이터(Desiccator)에 밤새 보관해둔 각 비드를 카본 테잎을 이용하여 콜렉터에 부착하였다. SEM을 찍기 전에, 각 비드를 Pt sputter를 이용하여 180초간 코팅하였다. 최종적으로 10kV 가속 전압에서 SEM 이미지를 수득하였다. 또한, 압축 단계 또는 탈-압축된 단계에서의 각 비드의 탄성력을 확인하기 위하여, 각 농도의 비드의 복원 정도를 10분 간격으로 관찰하였다. 또한, 마이크로미터를 이용하여 비드의 압축과정 및 시간에 따른 각 조건의 비드의 지름 변화를 측정하였다.

[94]

[95] **1-3.** 클라미도모나스 라인하르티(*Chlamydomonas reinhardtii*) 배양

[96] 야생형 클라미도모나스 라인하르티 CC-620을 18ml TAP media(Gibco, USA), pH 7.2의 조건인 플라스크에 접종하고, 이를 5 % CO_2 조건을 유지시키며 23도, 120 rpm으로 진탕배양기로 배양하였다. 빛은 OSRAM DULUX L FPL36EX-D lamps로 제공하였으며, 빛의 세기는 300μmm^{-2}s-1으로 유지시켰다.

[97] 세포 성장 및 분화의 동시화(Synchronization)를 확인하기 위하여, 광 및 암 기간의 조건 변화(12 h / 12 h)를 진행하였다. 3번째 사이클부터 세포의 동시화가 확인되었으며, 상기 세포의 동시화 여부는 동시화된 배양 과정에서 단위시간당 세포 광학 밀도를 X-ma 1000 분광광도계를 통해 측정하여 생장 곡선 커브를 그려 확인하였다. 생장 커브 변화는 3번째 암/광 사이클 동안 모니터링하였다. 4번째 광 기간이 시작될 때, 배양 희석을 통해 동조 세포(Synchronous cell) 접종농도(2×10^6 cell/ml)를 맞추어 접종할 접종액을 준비하였다. 상기 접종액을 비-스트레스 반응기와 유채 농화 스트레스 반응기(fluid shear stress reactor)에 각각 접종하였다.

[98]

[99] **1-4.** 클라미도모나스 라인하르티(*Chlamydomonas reinhardtii*)의 생존력 및 세포사멸(apoptosis)

[100] 상기 1-3의 반응기로부터 얻은 각 샘플을 TAP media을 포함하는 1 mM sytox Green (Molecular Probes)를 통해 10분간 실온에서 염색하였다. 각 샘플을 confocal laser microscope(LSM 510 META)를 이용하여 촬영하였으며, 488 nm

(Ar-laser)/505-530 nm(여기/방출)에서 live cell을 543nm (HeNe-laser)/560 nm (여기/방출)에서 사멸된 세포를 촬영하였다. 또한, Dual fluorescence image는 ZEN 2009 light Edition software(Carl Zeiss)를 통해 병합하였으며, 최소 500개 이상의 세포를 ×100 배율에서 무작위로 설정하여 클라미도모나스 라인하르티 세포의 생존력 및 세포사멸 정도(%)를 계산하였다.

[101]

[102] **1-5. 세포 형태**

[103] 압축된 세포와 탈-압축된 세포의 형태를 비교 및 분석하기 위하여, 상기 1-1의 압축 단계 및 탈-압축 단계에서 얻은 세포를 13,500 g에서 20초간 원심분리하여 이를 0.25% 글루타르알데히드(glutaraldehyde)를 통해 고착(fixation)시켰다. 이 후, 현미경을 통해 세포 멤브레인 분포 및 비편모조류화(deflagellation) 여부를 관찰하였고, Cellometer Auto T4 Cell Counter (Nexcelom Bioscience) (n>50)을 통해 세포 크기를 측정하였다.

[104]

[105] **1-6. 자극 장치에서 수득한** 클라미도모나스 라인하르티의 세포질 유리(free) 칼슘이온**유입의 확인**

[106] 본원 발명의 자극 장치의 회수 탱크에서 수득한 클라미도모나스 라인하르티(1×10^5 cell/ml)를 13,500 g로 20초간 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 남은 펠렛을 1 mM 설핀파라존(sulfinpyrazone)이 포함된 NMG+/K+ 완충액(1 mM 설핀파라존을 포함하고, pH 5.6까지 N-methyl-D-glucamine (NMG)을 추가하고, 5 mM HEPES, 10 mM HCl, 1 mM KCl, 200 μM K+ BAPTA을 포함함)과 DMSO (Sigma-Aldrich)에 용해된 3 μM Fura-2에 용해하였다. 해당 각 시료를 36도, 2시간 조건으로 배양한 뒤 TAP배지를 이용하여 3회 세척하였다. 이 후, dye-free NMG+/K+ 완충액(pH 6.8)을 첨가하여 4도에서 10분간 암 조건로 배양하였다. 공초점 현미경을 이용하여 세포의 Fura-2-Ca^{2+}를 촬영하였다.

[107]

[108] **1-7.** 설포-포스포-바닐린 방법(비색법)(Sulpho-phospho-vanillin method (colorimetric method))

[109] 본원 발명의 자극 장치의 회수 탱크에서 수득한 클라미도모나스 라인하르티(1×10^5 cell/ml)를 13,500 g로 20초간 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 세포의 펠렛에 95% 에탄올(Samshun pure chemical)을 넣어 밤새 처리한 후, 13,500 g로 10분간 원심분리하였다. 이 후, 펠렛을 제거하고 상등액 (100% ethanol+lipid)을 96-well plate에 옮긴 후, 드라이 오븐에서 90도로 증발시키고 각 웰에 100 μl의 황산(sulfuric acid)을 첨가하여 90도에서 20분간 반응시켰다. 이 후, 50 ㎕ 바닐린-인산염(vanillin-phosphate)(0.25 mg/ml vanillin in 17% phosphoric acid)를 각 웰에 첨가하여 실온에 10분간 반응시킨 후, ELISA를 통해 540 nm에서 OD값을 측정하였다.

[110]

[111] **1-8.** GC-MS 분석

[112] 본원 발명의 자극 장치의 회수 탱크에서 수득한 클라미도모나스 라인하르티(1×10^5 cell/ml)를 13,500 g로 20초간 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 세포의 펠렛에 1.0 ml의 톨루엔 및 10% (v/v) 메탄올 내 염화아세틸을 첨가하여 재-현탁하였다. 그 후, 샘플을 120분, 70도에서 배양하고, 차갑게 식힌 후, 0.2 ml의 증류수를 첨가하여 반응을 정지시켰다. FAMEs를 1.25 ml의 hexane - methyl tert-butyl ether (1:1)을 추가하여 추출하고, 10분간 부드럽게 흔들어준 후, 2500×g, 6분간 원심분리하고 유기층(상부층)을 다른 새로운 튜브로 옮겼다. 시료를 클린업하기 위하여, 3 ml의 클리닝 시약(10.8 g NaOH in 900 ml dH_2O)을 넣고 5분간 흔들어 준 뒤, 유기층(상부층)을을 다른 새로운 튜브로 옮긴 후 40도에서 증발시켰다. FAMEs의 재현탁은 헥산을 이용하였으며, 상기 FAMEs 시료를 J&W GC column DB-5ms (30 m × 0.25 mm × 0.25 ㎛)를 포함하고, 검출기로서 LECO Pegasus III Time-of-Flight Mass Spectrometer(TOMS) (Agilent Tech)가 설치된 Agilent 6890N 가스 크로마토그래피에 주입하였다. 280도의 유입 온도에서 10:1 분열(split) 조건으로 1 ㎕의 주입 부피를 수행하였으며, 캐리어 가스는 헬륨을 이용하였고, 고정된 유량은 1 mL/min으로, 30도로 10분, 램프는 10도/분에서 300도까지 조건을 두었고, 10분간 유지하는 조건으로 수행하였다. FAMEs 시료의 GC 분석은 KIST(Korea Institute of Science and Technology)의 ACC(Advanced Analysis Center)에 의뢰하여 분석하였다.

[113]

[114] **1-9. 나일 레드 염색(Nile red staining)을 통한 클라미도모나스 라인하르티 지질의 정성 분석**

[115] 본원 발명의 자극 장치를 이용하여 기계적 자극을 받은 클라미도모나스 라인하르티의 지질 생산량 변화를 정성적으로 확인하기 위해서 Nile red staining (Sigma Aldrich)를 수행하였다. 본원 발명의 자극 장치의 회수 탱크에서 수득한 클라미도모나스 라인하르티의 배양액을 2.5% 글루타르알데히드(glutaraldehyde)를 밤새 처리하여 세포를 고정하였다. 이후 배양액과 Nile Red dye를 3:1 비율로 혼합하여 10분간 40도로 암조건에서 배양하였다. 상기 시료의 이미지는 공초점 현미경을 여기 파장(excitation wavelength)은 543nm, 분출 파장(emission wavelength) 630nm으로 하여 확인하였다.

[116]

[117] **1-10.** qRT-PCR(Quantitative real-time PCR 수행

[118] mRNA 발현 정도를 확인하여 lipid를 정량적으로 분석하기 위하여 Real time qPCR을 수행하였다. 본원 발명의 자극 장치의 회수 탱크에서 수득한 클라미도모나스 라인하르티 배양액을 그람 아이오딘(gram iodine)(10 : 1 v/v)로 고정하여 혈구계산판(hemocytometer)(Superior)을 이용하여 세포 수를 계산하였다. 각 시료의 세포 수 조건을 동일하게 맞추기 위해 세포 수 계산

결과를 바탕으로 희석하여 각 시료의 세포 수를 5-6×10^6 cell/ml(기준값)로 맞추었다. 각 시료를 PBS로 세척한 후, 10,000rpm에서 15초간 원심분리하였다. 이 후, 상등액을 제거한 펠렛을 RNAeasy Plant Mini Kit(Qiagen)를 이용하여 gDNA 제거 후, total RNA을 추출하였다. 상기 각 시료의 RNA 누락을 방지하기 위해 Reverse Transcription Kit(Qiagen)를 이용하여 cDNA로 합성 후 QuantiFast SYBR Green PCR Kit (Qiagen)와 PCR장치인 Rotor-Gene Q (Qiagen)를 이용하여 유전자를 증폭하였다. PCR에는 하기 표 1의 총 6가지의 primer(CBLP, Actin, ACCase, DGAT, LPAAT 및 Mat3)가 사용되었으며, 각 primer에 대한 threshold 0.1 기준의 사이클 시간을 Rotor-Gene Q Series Software(Qiagen)를 이용하여 delta-delta Ct value로 데이터화하였다. 최종적으로 delta-delta Ct를 CBLP (housekeeping gene)의 발현 정도에 대한 각 프라이머별 mRNA의 상대 농도로 일반화하여 확인하였다.

[119] [표 1]

[120]

유전자	Forward primer sequence (5'-3')	Reverse primer sequence (5'-3')
CBLP	CTACGTCAACACCGTGACCG	CATGGCAATGCCGTCCTT
Mat3	CGCGAGATATCCGGTCAT	CCAAGTGCAGAGCAAATCATC
E2F1	GCAGCCACACAGGAGGTT	CGGCTTGGTTGAGGTCAAGG
ACCase	CACAGACGGGTAGTTGTGGA	GAGCTACCTAAGCGCTCCTG
DGAT	CCCGGAGGGCACGTGTAT	CCGCGACAGCTAGGTTCCA
LPAAT	CGTGATGATAAACCGTGTGG	TCACCCTCAGGGAAGAACAG

[121]

[122] **실시예** 1. 폴리우레탄 비드(Polyurethane beed) 제작 및 이의 형태 및 지름 확인

[123] 상기 실험예 1-2의 방법에 따라, 폴리우레탄이 20% (w/v), 25% (w/v), 30% (w/v), 35% (w/v) 및 40% (w/v)로 함유된 폴리우레탄 비드를 제형하였고, 이의 형태, 지름, 표면 및 단면을 확인하였다. 그 결과를 도 3, 표 1 및 표 2에 나타내었다.

[124] 도 3의 a 및 표 1에 나타낸 바와 같이, 실시예 1에서 제형된 각각의 폴리우레탄 농도 20% (w/v), 25% (w/v), 30% (w/v), 35% (w/v) 및 40% (w/v)에 대한 폴리우레탄 비드의 형태를 확인한 결과, 20% (w/v)의 비드는 낮은 밀도로 매우 불안정한 제형이 나타나 제형 후, 수압에 의한 비드 수축(bead shrink) 현상이 나타남을 확인하였다. 35% (w/v) 및 40% (w/v) 비드는 점성이 강하여 꼬리가 달린 형태로 제형되어 불안정함을 확인하였다. 25% (w/v) 및 30% (w/v) 농도의 폴리우레탄 비드의 제형은 일정한 구형으로, 안정적인 제형이 형성됨을 확인하였다.

[125] 또한, 도 3의 b 및 표 2에 나타낸 바와 같이, 실시예 1에서 제형된 각각의 폴리우레탄 농도 20% (w/v), 25% (w/v), 30% (w/v), 35% (w/v) 및 40% (w/v)에 대한 폴리우레탄 비드의 지름을 확인한 결과, 20% (w/v) 농도의 폴리우레탄 비드는 평균 2.410 ㎝, 25% (w/v) 농도의 폴리우레탄 비드는 평균 2.507 ㎝, 30% (w/v) 농도의 폴리우레탄 비드는 평균 2.499 ㎝, 35% (w/v) 농도의 폴리우레탄

비드는 평균 2.483 ㎝ 및 40% (w/v) 농도의 폴리우레탄 비드는 평균 2.353 ㎝임을 확인하였다.

[126] 또한, 도 3의 c를 확인한 결과, 30% (w/v)의 폴리우레탄 비드의 표면은 미세한 구멍이 무수히 존재하는 다공성 구조이고, 단면 내에는 특정 크기의 빈 공간이 존재하는 것을 확인하였다.

[127] 또한, 압축 단계 또는 탈-압축 단계에서 각 농도의 폴리우레탄 비드의 복원 정도는 폴리우레탄 농도가 낮을수록 복원되는 속도가 빨랐으며, 40%(w/v)의 폴리우레탄 비드를 제외한 모든 비드가 50분 이내로 복원되는 것을 확인하였다.

[128]

[129] 따라서, 본 발명의 자극 장치에 이용 시, 우수한 탄성력 및 복원력을 지니는 30%(w/v) 폴리우레탄 비드가 가장 최적임을 확인하였다.

[130]

[131] **실시예** 2. 본 발명의 자극 장치를 이용한 자극 조건에서 폴리우레탄 비드의 강인성(Robustness) 확인

[132] 본 발명의 자극 장치를 이용한 자극 조건에서 폴리우레탄 비드의 강인성(Robustness)을 확인하였다.

[133] 구체적으로, 반복적으로 폴리우레탄 비드를 압축 단계 및 탈-압축 과정 횟수를 1 내지 10회 수행하여 30%(w/v)의 폴리우레탄 비드가 복원되는 정도를 확인하여 물리적 특성 변화(크기 및 탄성력)를 확인하였다. 또한, 본 발명의 자극 장치를 이용한 자극 조건에서 비드가 녹색으로 변색됨을 확인함에 따라, 비드의 특성 변화 여부 및 회수 과정에 영향을 줄 수 있는 클라미도모나스 라인하르티의 비드 내부로 침투 여부를 확인하기 위하여, 클라미도모나스 라인하르티와 비드를 일주일 이상 배양하고, 비드 표면을 세척한 액체(TAP media)(solution A) 및 비드가 흡수한 내부 액체(TAP media)(solution B)에 대한 흡광도를 확인하였다. 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[134] 도 4의 a에 나타낸 바와 같이, 압축 단계 및 탈-압축 과정에도 본 발명의 폴리우레탄 비드의 크기 및 탄성력은 변하지 않고 그대로 유지됨을 확인하여, 강인성이 뛰어남을 확인하였다.

[135] 도 4의 b에 나타낸 바와 같이, 방출된 클라미도모나스 라인하르티의 색소가 폴리우레탄 비드 표면에 흡착된 것으로, 비드 내부의 미세한 공극을 통과하여 세포가 비드 내부로 흡수된 것이 아님을 확인하였다. 따라서, 비드 변색 현상은 클라미도모나스 라인하르티의 지질 생산에 영향을 미치지 않는 것으로 확인하였다.

[136]

[137] **실시예** 3. 본 발명의 자극 장치를 이용한 자극 조건에서 클라미도모나스 라인하르티의 세포 크기, 칼슘 유입-매개된 비편모조류화(deflagellation) 및 생리학적 변화 관련 유전자 발현 확인

[138] 본 발명의 자극 장치를 이용한 자극 조건에서 클라미도모나스 라인하르티의

세포 크기, 칼슘 유입-매개된 비편모조류화(deflagellation) 및 형태적 변화 관련 유전자 발현 정도를 확인하였다.

[139] 구체적으로, 본 발명의 자극 장치를 이용하여 자극된 클라미도모나스 라인하르티와 이의 대조군 세포와 비교하여, 상기 실험예 1-5의 방법에 따라, 12시간 또는 24시간 자극된 클라미도모나스 라인하르티 세포 및 대조군 세포의 크기를 확인하였다. 실험예 1-6의 방법에 따라, 2시간 자극된 클라미도모나스 라인하르티 세포 및 대조군 세포의 세포질 유리(free) Ca^{2+} 유입을 확인하였다. 또한, 실험예 1-10의 방법에 따라 qRT-PCR(Quantitative real-time PCR 수행하여 생리학적 변화와 관련된 Mat3 및 E2F1의 mRNAs 발현 정도를 확인하였다. 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[140] 도 5의 a 및 b에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 자극 장치를 이용하여 자극된 클라미도모나스 라인하르티 세포는 멤브레인 왜곡(membrane distortion)이 유도되어 칼슘 유입이 대조군 세포보다 증가되어 비편모조류화(deflagellated)됨을 확인하였다.

[141] 도 5의 c에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 자극 장치를 이용하여 12시간 동안 자극된 클라미도모나스 라인하르티 세포의 크기는 최대 7.2 ㎛임을 확인하였다. 24시간 동안 자극된 세포는 7.8 ㎛이고, 대조군은 6.7 ㎛임을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 자극 장치를 이용하여 자극된 클라미도모나스 라인하르티 세포는 대조군보다 세포의 크기가 더 커짐을 확인하였다

[142] 도 5의 d에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 자극 장치를 이용하여 자극된 클라미도모나스 라인하르티 세포에서 생리적 변화와 관련된 Mat3의 mRNAs가 자극 12시간 조건에서 유의적으로 증가됨을 확인하였다. 상기 Mat3의 발현이 유의적 변화가 있다는 점에서, 압축 스트레스에 의해 클라미도모나스의 세포 사이클의 생리적 변화가 발생했음을 확인하였다.

[143]

[144] **실시예** 4. 본 발명의 자극 장치를 이용한 자극 조건에서 클라미도모나스 라인하르티의 지질 생성 확인

[145] 본 발명의 자극 장치를 이용한 자극 조건에서 클라미도모나스 라인하르티의 지질 생산을 확인하였다.

[146] 구체적으로, 본 발명의 자극 장치를 이용하여 자극된 클라미도모나스 라인하르티와 이의 대조군 세포와 비교하여, 실험예 1-9의 나일 레드 염색(Nile red staining) 방법을 이용하였고, 본 발명의 자극 장치를 이용하여 0, 4, 8, 12 및 24 시간 자극 조건을 주었다. 또한, 본 발명의 50 ml 자극반응 탱크에 자극기를 이용하여 0, 4 또는 8 ml 부피로 압력을 가하여 세포에 대한 각 자극 조건을 달리하였다. 상기 각 조건에 따른 클라미도모나스 라인하르티 세포 또는 대조군의 지질 소립(lipid droplet) 생성을 정성 및 정량 분석을 수행하였다. 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[147] 도 6의 a 및 b에 나타낸 바와 같이, 자극 시간이 지남에 따라, 또는 압력 정도에

따라 본 발명의 자극 장치를 이용하여 자극된 클라미도모나스 라인하르티 세포 내부의 지질 소립이 증가됨을 확인하였다.

[148]

[149] **실시예 5.** 본 발명의 자극 장치를 이용한 자극 조건에서 클라미도모나스 라인하르티의 지질 생산 효율 확인

[150] 본 발명의 자극 장치를 이용한 자극 조건에서 클라미도모나스 라인하르티의 지질 생산 효율을 확인하였다.

[151] 구체적으로, 압축 단계 또는 탈-압축단계를 통해 4, 8, 12 및 24 시간 동안 자극된 클라미도모나스 라인하르티 세포 또는 대조군의 지질 생산 효율을 상기 실험예 1-7의 설포-포스포-바닐린 방법(비색법)에 따라 확인하였다. 그 결과를 도 7에 나타내었다.

[152] 도 7의 a에 나타낸 바와 같이, 단세포의 지질 소립 합성 정도를 확인한 결과, 4시간 자극을 준 클라미도모나스 라인하르티 세포가 대조군과 비교하여 높은 단위세포 내 지질량이 측정됨을 확인하였다. 또한 4시간 간격으로 자극 시간이 증가함에 따라, 단위세포 내 지질의 대조군 세포 대비 증가율을 분석한 결과, 각각 65%(4시간), 78%(8시간), 47%(12시간)의 증가율이 확인되었다.

[153] 도 7의 b에 나타낸 바와 같이, 총 세포의 지질 소립 합성 정도를 확인한 결과, 대조군과 비교하여 총 세포의 지질 소립 합성이 증가되었음을 확인하였다.

[154] 따라서, 본 발명의 자극 장치를 이용하여 자극된 클라미도모나스 라인하르티는 대조군보다 지질 생산 효율이 우수함을 확인하였다.

[155]

[156] **실시예 6.** 본 발명의 자극 장치를 이용한 자극 조건에서 클라미도모나스 라인하르티의 지질 함량 변화

[157] 본 발명의 자극 장치를 이용한 자극 조건에서 클라미도모나스 라인하르티의 지질 함량의 변화를 확인하였다.

[158] 구체적으로, 본 발명의 자극 장치를 이용하여 4, 8 및 12시간 자극 조건을 주었다. 또한, 본 발명의 50 ml 자극반응 탱크에 자극기를 이용하여 0 또는 4ml 부피로 압력을 가하여 세포에 대한 각 자극 조건을 달리하였다. 상기 각 조건에 따라 자극된 클라미도모나스 라인하르티 세포의 지질 함량 변화를 실험예 1-8의 방법에 따라 분석하였다. 그 결과를 도 8 및 표 2에 나타내었다.

[159] [표 2]

[160]

지방산	대조군	4h-0ml	4h-4ml	8h-0ml	8h-4ml	12h-0ml	12h-4ml
C14:0	5.78	5.46	8.26	4.77	4.41	5.30	4.49
C16:0	27.38	26.6	22.3	23.28	25.26	24.59	32.68
C18:0	23.73	17.5	21.46	17.42	16.57	20.07	19.54
C18:2	0.00	1.37	1.22	0.83	0.91	1.27	1.09
C18:3	0.00	1.98	1.43	1.11	1.12	1.42	1.64
C20:0	10.94	15.52	9.77	12.44	14.74	9.61	8.04
ΣPUFAs	0.00	3.35	2.64	1.94	2.02	2.69	2.73
ΣOthers	32.17	31.58	35.57	40.14	37.0	37.74	32.53

[161]

[162] C14, C16, C18, C20, C21, C24, C27, C28 및 C29의 사슬 길이를 갖는 지방산을 함유함을 확인하였다. 또한, 대조군에 비해 압축 스트레스를 받은 모든 클라미도모나스 라인하르티 세포에서 다가불포화지방산(Polyunsaturated fatty acid, PUFA)가 발생하는 것을 확인할 수 있었다. 따라서, 압축 스트레스에 의해 클라미도모나스 라인하르티 세포 내에 지질 구성이 변화하는 것을 알 수 있었다.

[163]

[164] **실시예** 7. 본 발명의 자극 장치를 이용한 자극 조건에서 클라미도모나스 라인하르티의 지질 관련 mRNA 확인

[165] 본 발명의 자극 장치를 이용한 자극 조건에서 클라미도모나스 라인하르티의 지질 관련 mRNA 발현 정도를 확인하였다.

[166] 구체적으로, 4, 8, 12 및 24 시간 자극 조건에 따라 자극된 클라미도모나스 라인하르티 세포의 지질 관련 mRNA 발현 정도를 실험예 1-10의 방법에 따라 분석하였다. 그 결과를 도 9에 나타내었다.

[167] 도 9에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 자극 장치에 따라 자극된 클라미도모나스 라인하르티 세포가 대조군 세포와 비교하여 ACCase, DGAT 및 LPAAT의 mRNA 발현이 상향-조절됨을 확인하여, 본 발명의 자극 장치에 따라 자극된 클라미도모나스 라인하르티 세포는 지질을 효과적으로 생산함을 확인하였다.

[168]

[169] **실시예** 8. 본 발명의 자극 장치를 이용한 자극 조건에서 클라미도모나스 라인하르티 세포의 세포사멸 정도의 확인

[170] 본 발명의 자극 장치를 이용한 자극 조건 또는 직접적 자극을 가한 조건에서 클라미도모나스 라인하르티 세포의 세포사멸 정도를 확인하였다.

[171] 구체적으로, 본 발명의 자극 장치를 이용하여 4, 8, 12 및 24 시간 자극 조건을 주었다. 또한, 본 발명의 50 ml 자극반응 탱크에 자극기를 이용하여 0 또는 4 ml

부피로 압력을 가하여 세포에 대한 각 자극 조건을 달리하였다. 또한, 도 10에 나타낸 바와 같이, 페트리 디쉬에 PDMS(polydimethylsiloxane)을 채워서 굳힌 후, 상기 굳혀진 PDMS와 페트리 디쉬의 평평한 면을 이용하여 세포에 직접적으로 자극을 가한 조건을 주었다.

[172] 상기 각 조건에 대한 클라미도모나스 라인하르티 세포의 세포사멸 정도를 실험예 1-4의 방법에 따라 확인하였다. 그 결과를 도 11에 나타내었다.

[173] 도 11에 나타낸 바와 같이, 직접적으로 세포에 자극을 가한 조건에서는 40% 이상의 세포사멸률(%)이 나타남을 확인하였다. 또한 24시간 자극 조건을 제외하고, 4ml 부피의 압력을 가한 조건과 4, 8 및 12 시간 자극 조건에서 세포사멸이 저해됨을 확인하였다.

[174]

[175] 상기 일련의 실험을 통하여, 본 발명의 자극 장치를 이용 시, 압축 단계, 탈-압축 단계 및 회수 단계를 거쳐 클라미도모나스 라인하르티 세포에 기계적 자극을 효과적으로 가하게 됨을 확인하였다. 또한, 상기 자극 장치 내 30%(w/v) 폴리우레탄 비드를 이용 시, 상기 비드는 우수한 탄성력, 복원력 및 강인성이 존재하여 효과적으로 세포에 자극을 가하고, 자극 시간은 1 내지 24시간 자극이 최적임을 확인하였다.

[176] 또한, 본 발명의 자극 장치를 이용하여 자극된 클라미도모나스 라인하르티 세포는 멤브레인 왜곡(membrane distortion)이 유도되어 칼슘 유입이 대조군 세포보다 증가되어 비편모조류화(deflagellation) 됨을 확인하였다. 또한, 생리적 변화와 관련된 Mat3 mRNAs 발현이 증가되어, 생리적 변화가 발생됨을 확인하였고, 자극 되지 않은 대조군과 비교하여 세포의 크기가 더 커짐을 확인하였다. 또한, 지질 관련된 ACCase, DGAT 및 LPAAT의 mRNA 발현이 증가되고, 자극된 클라미도모나스 라인하르티는 C14, C16, C18, C20, C21, C24, C27, C28 및 C29의 사슬 길이를 갖는 지방산을 함유하고, 대조군과 비교하여 다가불포화지방산(Polyunsaturated fatty acid, PUFA)이 발생하는 것을 확인하였고, 이에 따라, 압축 스트레스에 의해 클라미도모나스 라인하르티 세포 내에 지질 구성이 변화하는 것을 확인하였다.

청구범위

[청구항 1] 일측에 출구가 형성되고, 상기 출구를 개폐 가능하도록 형성된 필터를 구비하는 자극반응 탱크;
측면이 상기 자극반응 탱크의 내주면에 접하여 상기 자극반응 탱크 내부에서 승강 운동하는 자극기 헤드를 구비하는 자극기;
상기 자극반응 탱크 내부로 용액을 주입하거나, 상기 자극반응 탱크 내부의 용액을 흡입하여 배출시키는 펌프; 및
상기 자극반응 탱크 내부에 수용되는 탄성체 고분자 비드를 포함하고,
상기 자극기 헤드에는 상기 용액이 투과되는 노즐이 연결되는 것을 특징으로 하는 미세조류 세포 자극 장치.

[청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 자극기 헤드에는 상기 자극반응 탱크 내부로 세포가 주입되도록 하는 주입구가 구비된 것을 특징으로 하는 미세조류 세포 자극 장치.

[청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 펌프에 연결되고, 내부로 상기 용액이 흐르는 관; 및
상기 노즐은 일측이 상기 자극반응 탱크를 향하는 상기 관의 일단에 결합되고, 관에 결합되지 않은 타측이 자극기 헤드가 상승된 상태에서 자극기 헤드에 연결되는 것을 특징으로 하는 미세조류 세포 자극 장치.

[청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 펌프에 의해 상기 자극반응 탱크로부터 배출되거나, 상기 자극반응 탱크로 공급되는 용액이 저장되는 공급 탱크를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 미세조류 세포 자극 장치.

[청구항 5] 제1항에 있어서,
필터의 공극 크기는 800㎛~1200㎛인 것을 특징으로 하는 세포 자극 장치.

[청구항 6] 제3항에 있어서,
노즐의 공극 크기는 3㎛~10㎛ 인 것을 특징으로 하는 세포 자극 장치.

[청구항 7] 제1항에 있어서,
상기 탄성체 고분자 비드는
폴리(L-락트산-co-ε-카프로락톤)(Poly(L-lactide-co-ε-caprolactone)),
폴리락트산(PLA), 폴리글리콜산(PGA),
폴리(D,L-락트산-co-글리콜산)(poly(D,L-lactide-coglycolide)),
폴리(카프로락톤), 디올/디애시드계 지방족 폴리에스테르,
폴리에스테르-아미드/폴리에스테르-우레탄, 폴리우레탄,
폴리에틸렌옥사이드(Polyethylene oxide), 폴리(발레로락톤),
폴리(하이드록시부티레이트), 폴리(하이드록시 발러레이트), 키토산,
키틴, 알긴산, 콜라겐, 젤라틴 및 히알루론산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인 미세조류 세포 자극 장치.

[청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 폴리우레탄 비드는 폴리우레탄을 10~50%(w/v) 농도로 포함하는 것을 특징으로 하는 미세조류 세포 자극 장치.

[청구항 9] 제1항에 있어서,
상기 미세조류는 클라미도모나스 속(*Chlamydomonas sp.*)인 것을 특징으로 하는 미세조류 세포 자극 장치.

[청구항 10] 제1항에 있어서,
상기 클라미도모나스 속은 클라미도모나스 라인하르티(*Chlamydomonas reinhardtii*), 클라미도모나스 카다타(*Chlamydomonas caudate*), 클라미도모나스 모에우시(*Chlamydomonas moewusii*), 클라미도모나스 니바리스(*Chlamydomonas nivalis*) 및 클라미도모나스 오보이대(*Chlamydomonas ovoidae*)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 미세조류 세포 자극 장치.

[청구항 11] (a) 제1항의 미세조류 세포 자극 장치의 자극기를 이용하여 탄성체 고분자 비드를 압축하는 단계;
(b) 상기 미세조류 세포 자극 장치의 주입구에 미세조류의 세포를 주입하는 단계;
(c) 상기 미세조류 세포 자극 장치의 자극기를 상승 작용시킨 후 탄성체 고분자 비드가 복원되면서 미세조류 세포에 기계적 자극을 주는 단계; 및
(d) 상기 미세조류 세포 자극 장치의 필터를 개방하고 자극기를 하강 작용시킨 후 회수 탱크에 상기 미세조류 세포를 회수하는 단계;를 포함하는 미세조류의 지질 생산 증대 방법.

[청구항 12] 제11항에 있어서,
상기 (a)의 압축은 1 내지 48시간 가하는 것을 특징으로 하는, 미세조류의 지질 생산 증대 방법.

[청구항 13] 제11항에 있어서,
상기 (a)의 탄성체 고분자 비드는 폴리우레탄 비드인 것을 특징으로 하는, 미세조류의 지질 생산 증대 방법.

[청구항 14] 제11항에 있어서,
상기 미세조류는 클라미도모나스 속(*Chlamydomonas sp.*)인 것을 특징으로 하는, 미세조류의 지질 생산 증대 방법.

[청구항 15] 제14항에 있어서,
상기 클라미도모나스 속은 클라미도모나스 라인하르티(*Chlamydomonas reinhardtii*), 클라미도모나스 카다타(*Chlamydomonas caudate*), 클라미도모나스 모에우시(*Chlamydomonas moewusii*), 클라미도모나스 니바리스(*Chlamydomonas nivalis*) 및 클라미도모나스 오보이대(*Chlamydomonas ovoidae*)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 미세조류의 지질 생산 증대 방법.

[청구항 16] 제11항에 있어서,

상기 지질은 포화 또는 불포화 지방산인 것을 특징으로 하는, 미세조류의 지질 생산 증대 방법.

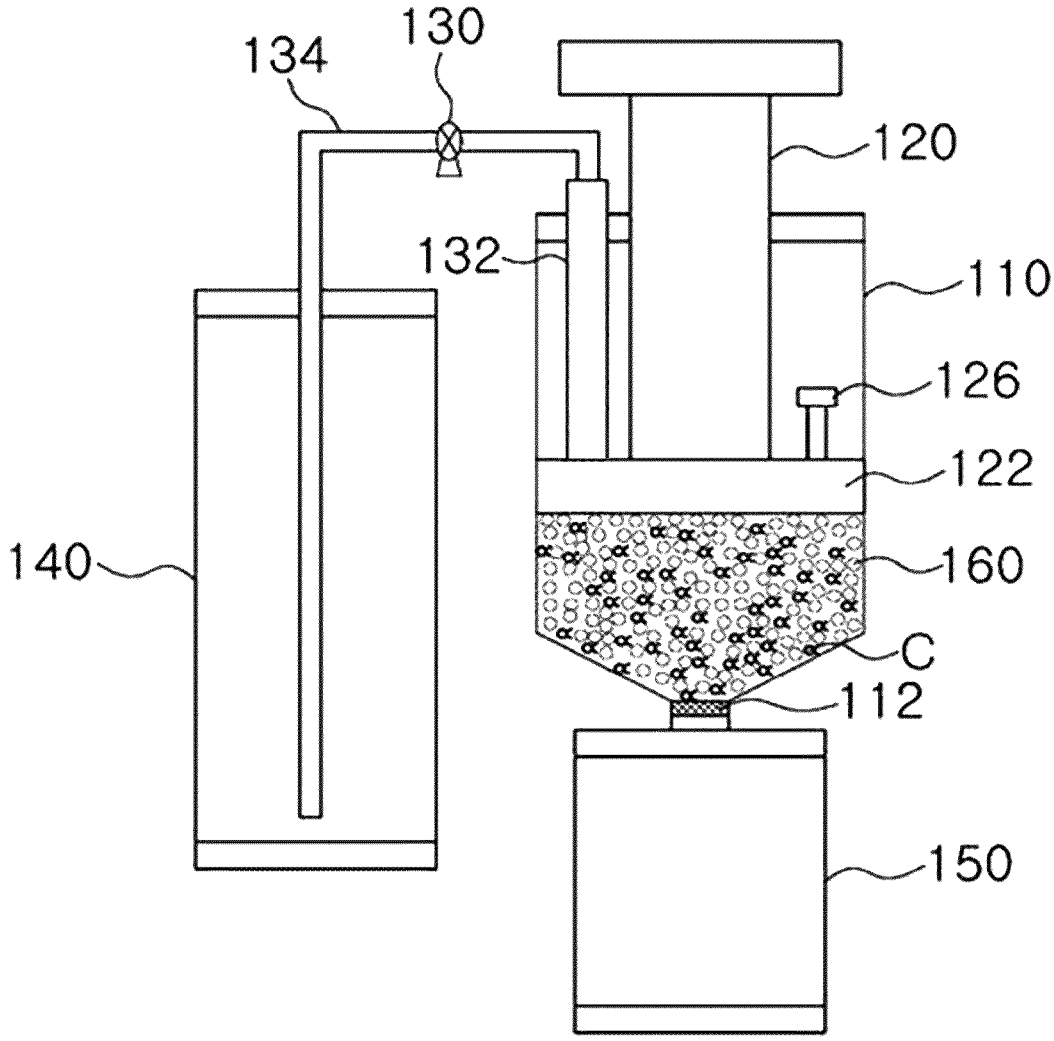
[청구항 17] 제16항에 있어서,
상기 포화 또는 불포화 지방산은 C14, C16, C18, C20, C21, C24, C27, C28 및 C29으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 사슬 길이를 갖는 지방산인 것을 특징으로 하는, 미세조류의 지질 생산 증대 방법.

[청구항 18] (a) 제1항의 미세조류 세포 자극 장치의 자극기를 이용하여 탄성체 고분자 비드를 압축하는 단계;
(b) 상기 미세조류 세포 자극 장치의 주입구에 미세조류의 세포를 주입하는 단계;
(c) 상기 미세조류 세포 자극 장치의 자극기를 상승 작용시킨 후 탄성체 고분자 비드가 복원되면서 미세조류 세포에 기계적 자극을 주는 단계; 및
(d) 상기 미세조류 세포 자극 장치의 필터를 개방하고 자극기를 하강 작용시킨 후 회수 탱크에 상기 미세조류 세포를 회수하는 단계;를 포함하는 지질 생산이 증대된 미세조류의 제조 방법.

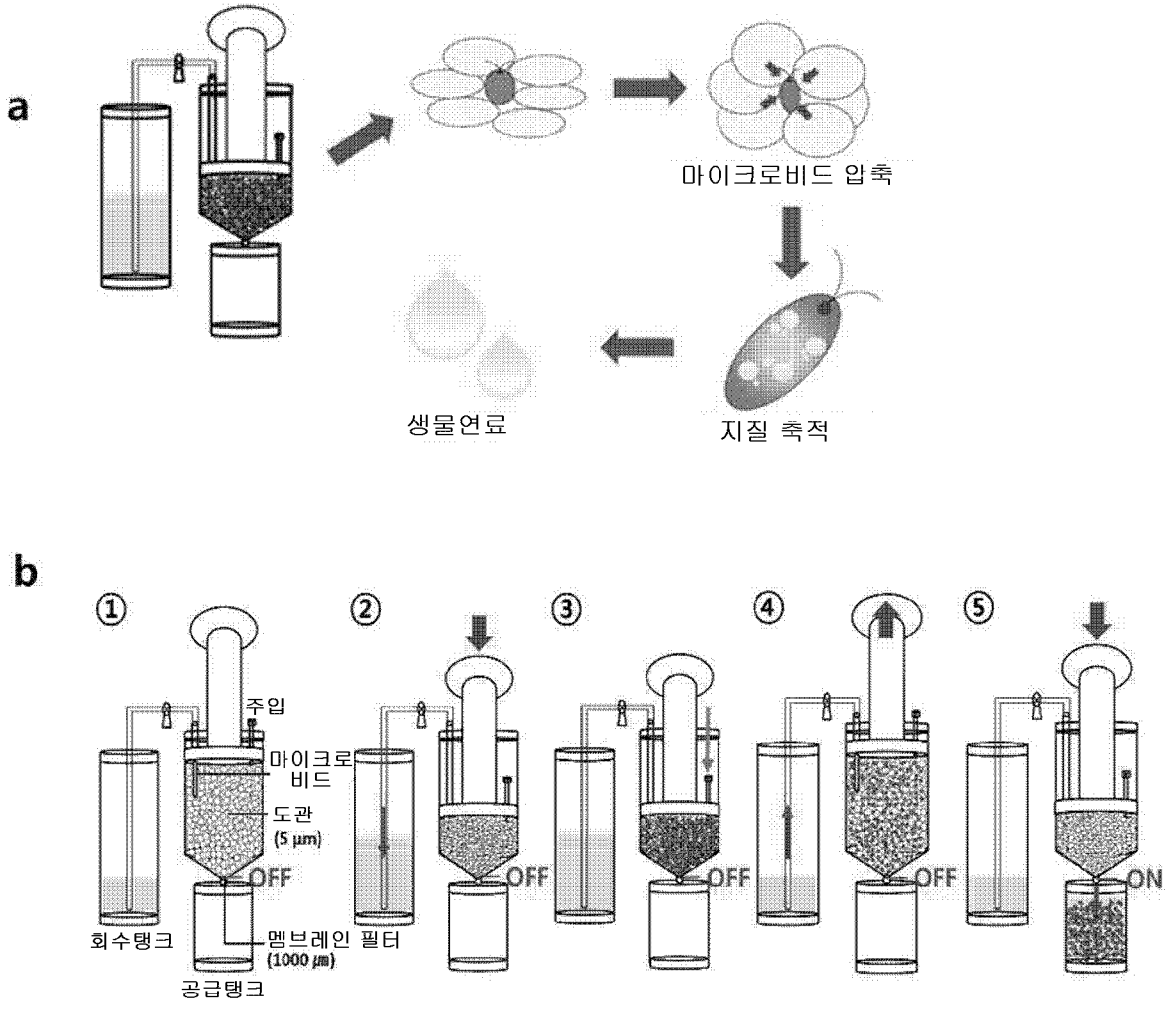
[청구항 19] 제18항에 있어서,
상기 미세조류는 비편모조류화(deflagellation)된 것을 특징으로 하는, 지질 생산이 증대된 미세조류의 제조 방법.

[청구항 20] 제18항의 제조 방법으로 지질 생산이 증대된 미세조류.

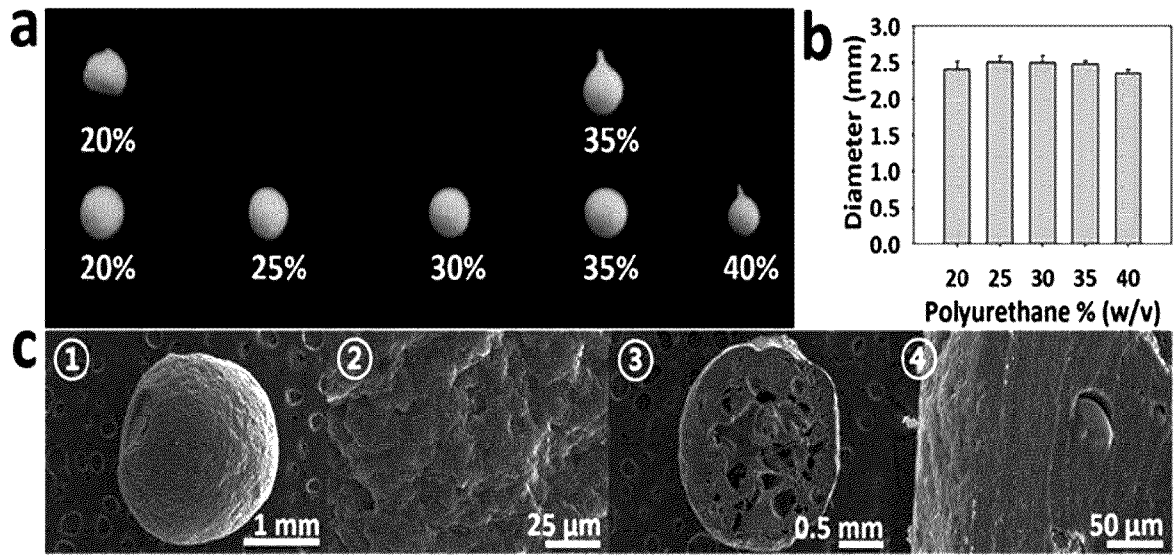
[도1]



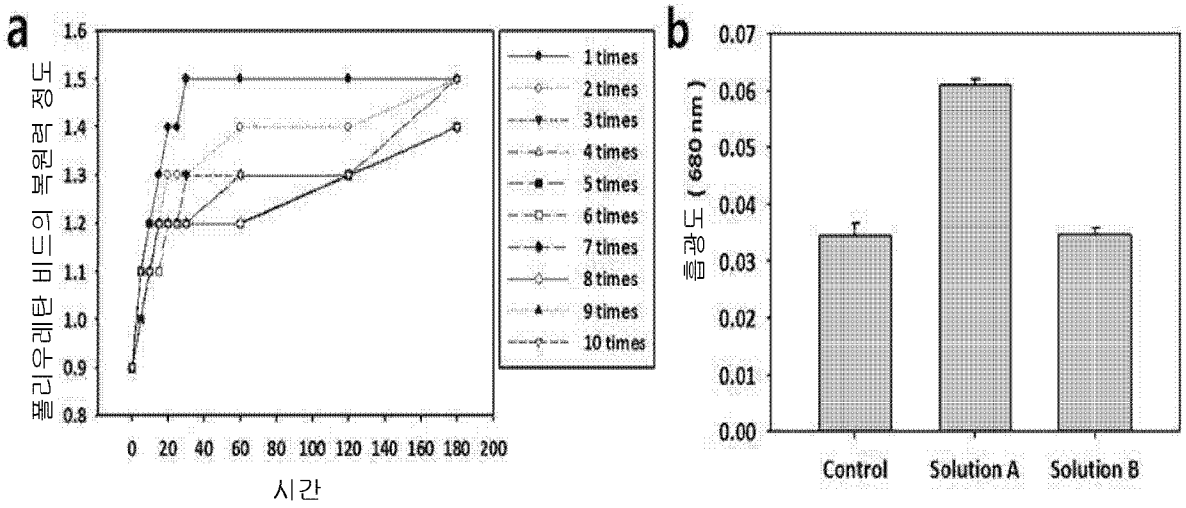
[도2]


a
마이크로비드 압축
생물연료
지질 축적
b
①
②
③
④
⑤
주입
마이크로
비드
도관
(5 μm)
OFF
회수탱크
멤브레인 필터
(1000 μm)
공급탱크
OFF
OFF
OFF
ON

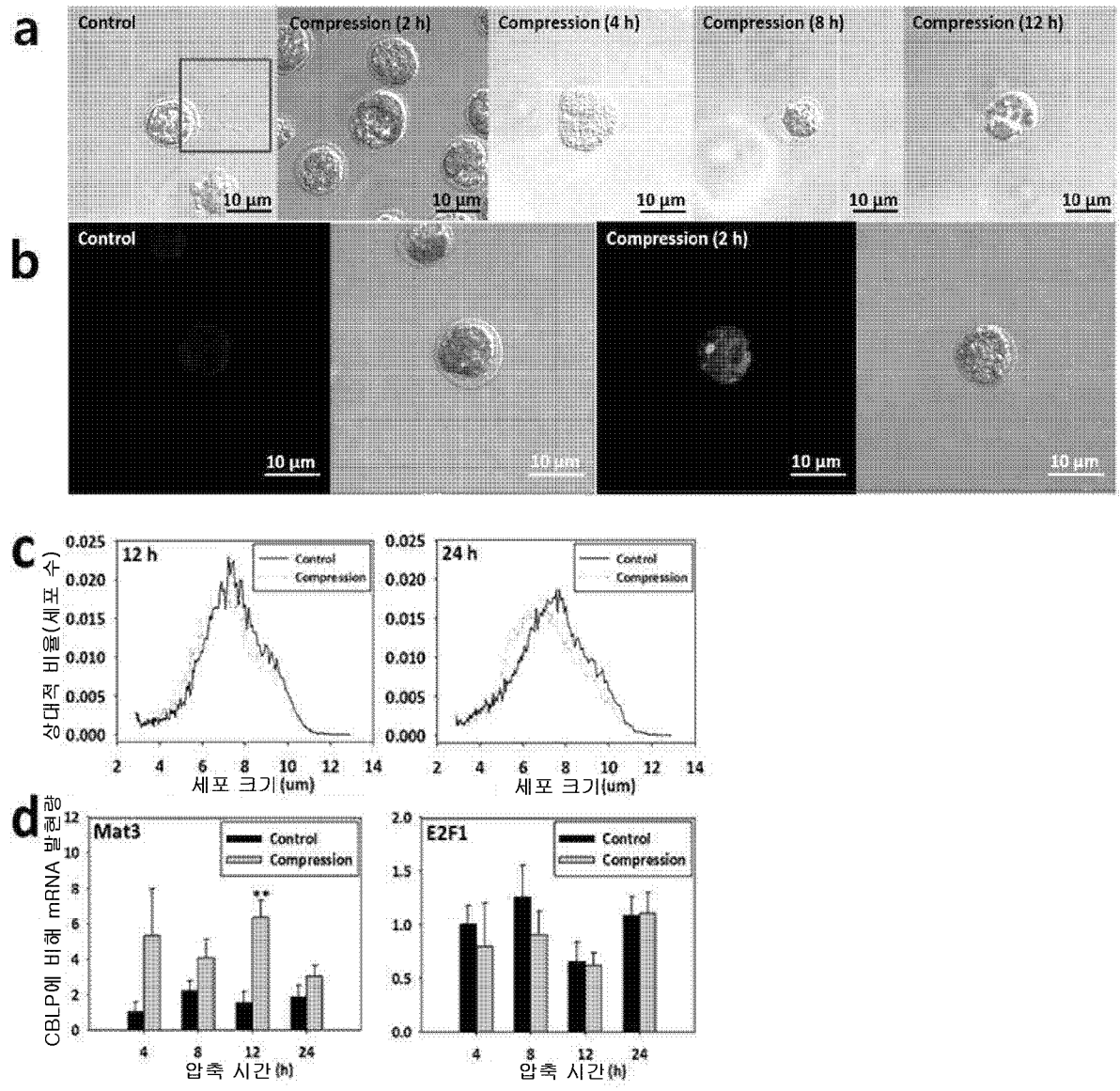
[도3]


a
20%
35%
20%
25%
30%
35%
40%
b
Diameter (mm)
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
20 25 30 35 40
Polyurethane % (w/v)
c
①
②
③
④
1 mm
25 μm
0.5 mm
50 μm

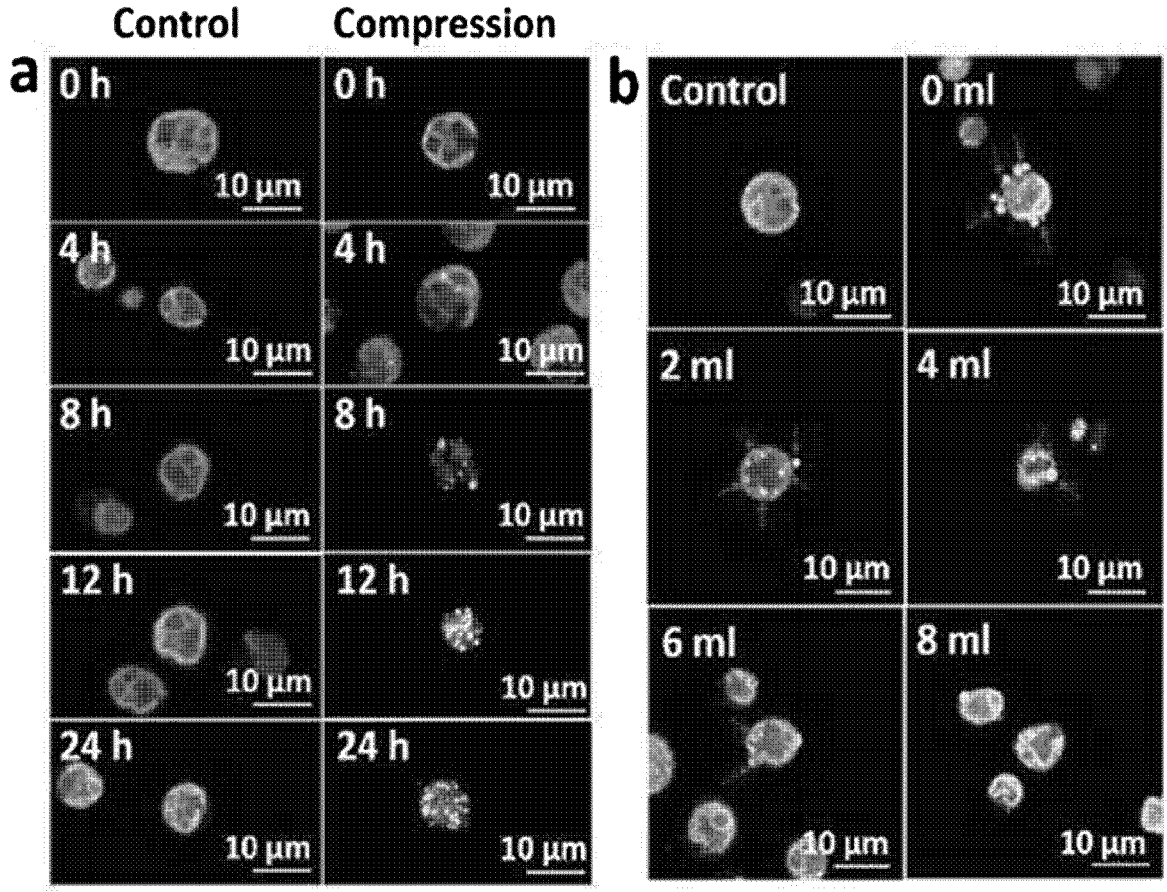
[도4]


a
폴리우레탄 비드의 복원력 정도
1.6
1.5
1.4
1.3
1.2
1.1
1.0
0.9
0.8
0 20 40 60 80 100 120 140 160 180 200
시간
1 times
2 times
3 times
4 times
5 times
6 times
7 times
8 times
9 times
10 times
b
흡광도 (680 nm)
0.07
0.06
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0.00
Control
Solution A
Solution B

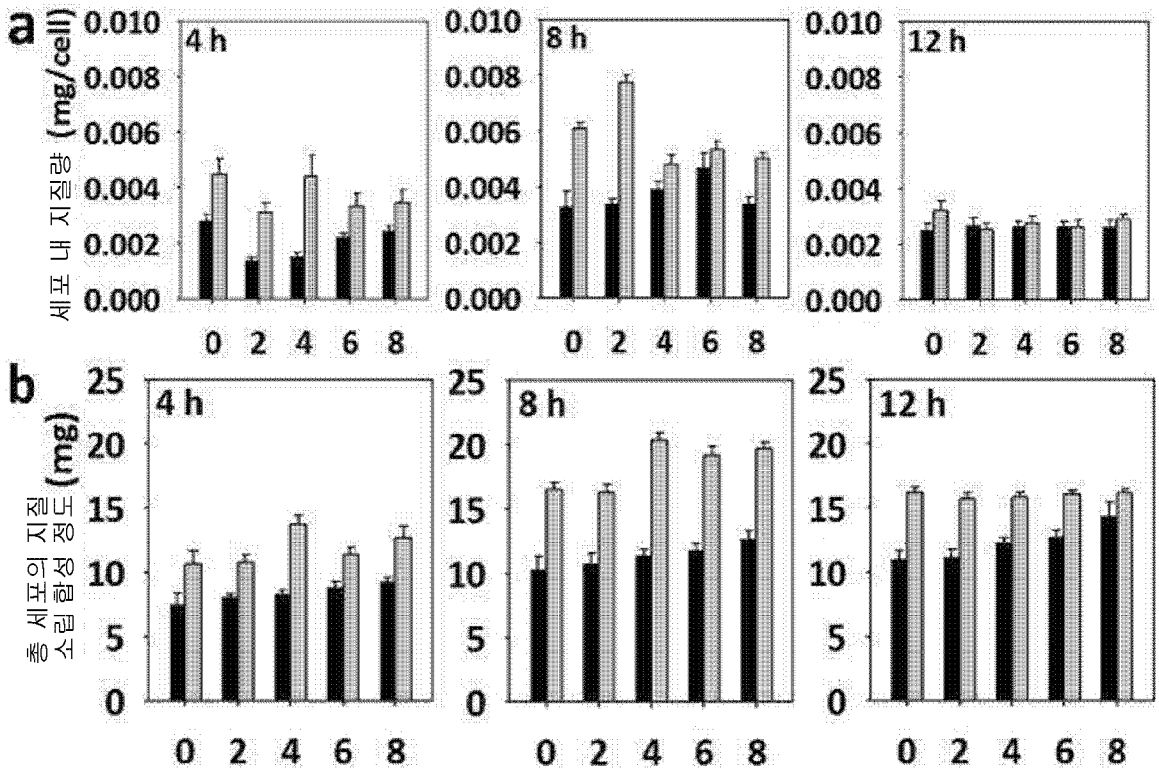
[도5]


a
Control
Compression (2 h)
Compression (4 h)
Compression (8 h)
Compression (12 h)
10 μm
b
Control
Compression (2 h)
10 μm
c
상대적 비율(세포 수)
12 h
24 h
Control
Compression
0.025
0.020
0.015
0.010
0.005
0.000
2 4 6 8 10 12 14
세포 크기 (um)
d
CBLP에 비해 mRNA 발현량
Mat3
E2F1
**
4 8 12 24
압축 시간 (h)

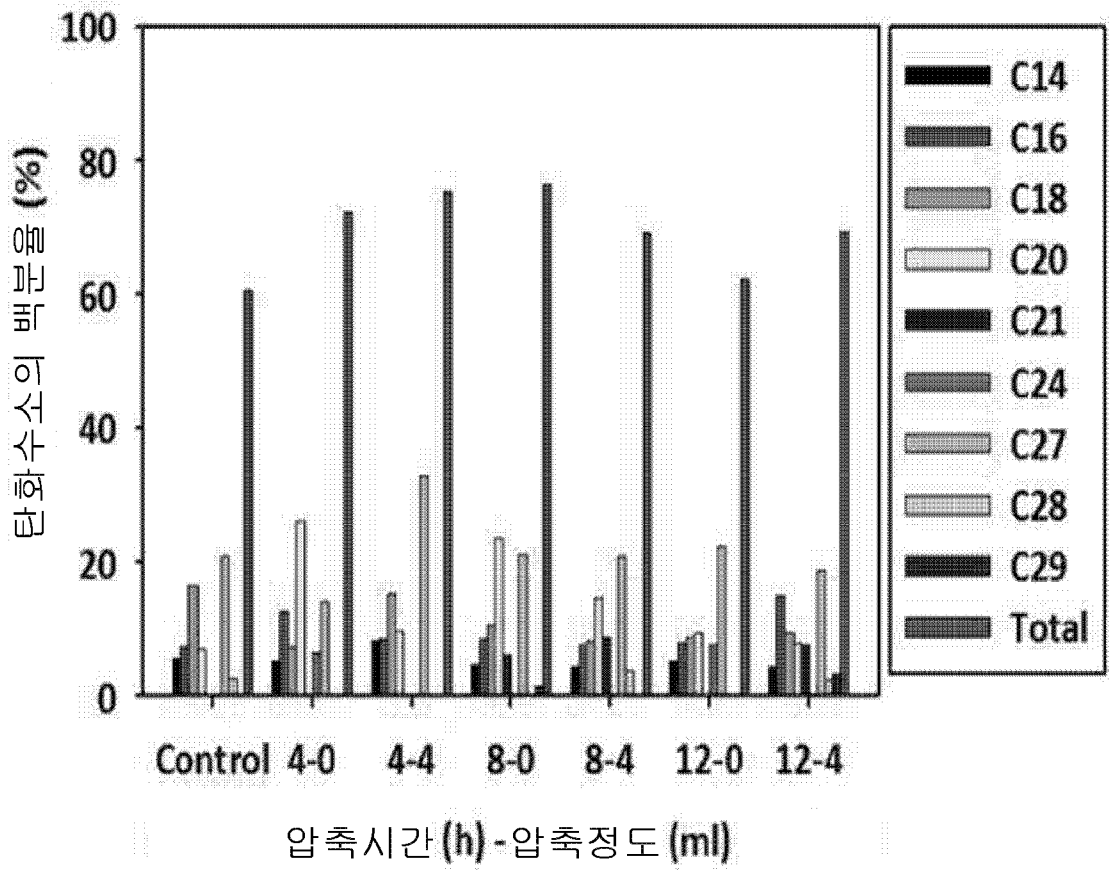
[도6]


Control
Compression
a
0 h
4 h
8 h
12 h
24 h
10 μm
b
Control
0 ml
2 ml
4 ml
6 ml
8 ml

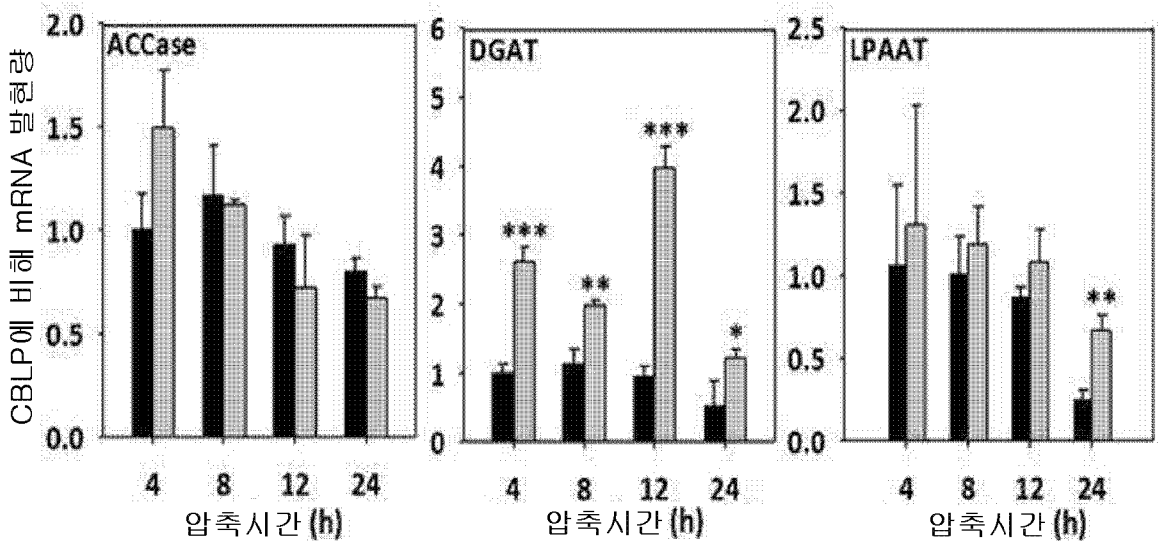
[도7]


a
세포 내 지질량 (mg/cell)
0.010
0.008
0.006
0.004
0.002
0.000
4 h
8 h
12 h
0 2 4 6 8
b
총 세포의 지질 소립합성 정도 (mg)
25
20
15
10
5
0

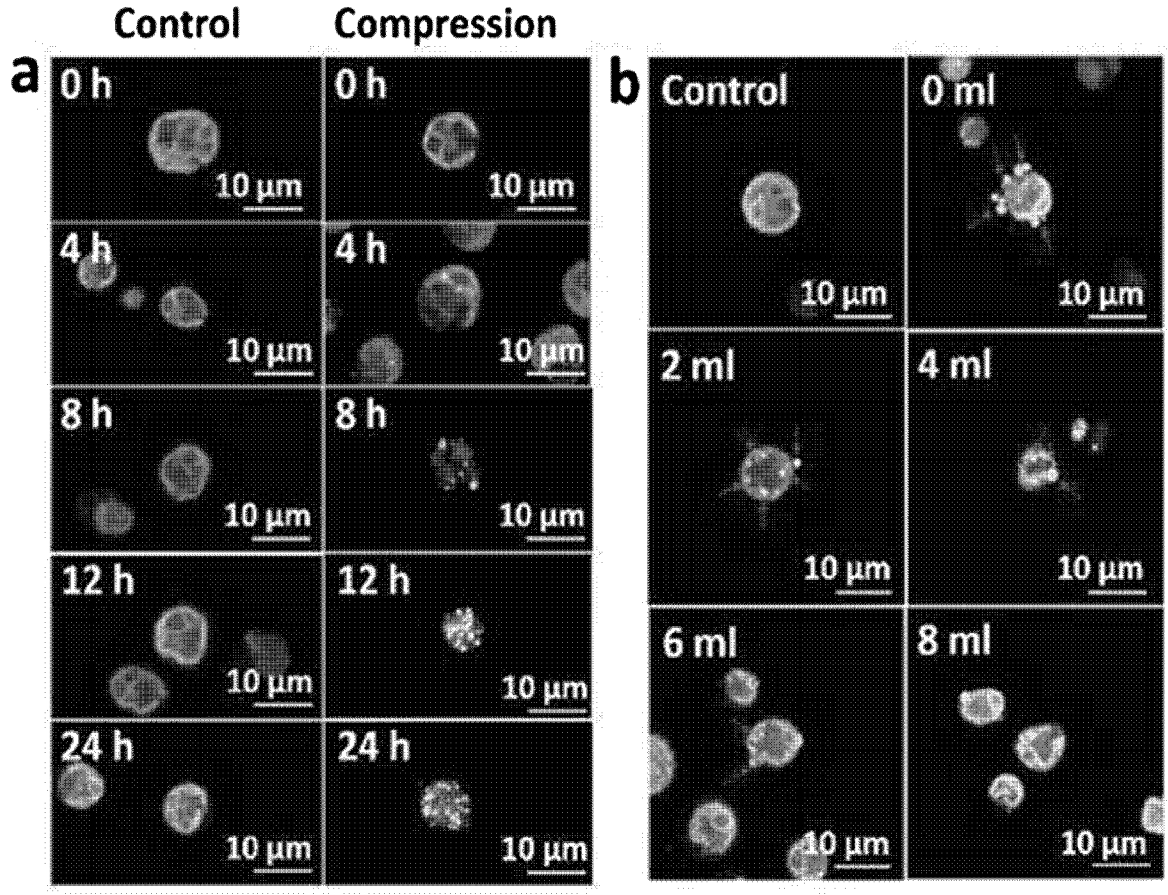
[도8]


100
80
60
40
20
0
탄화수소의 백분율 (%)
C14
C16
C18
C20
C21
C24
C27
C28
C29
Total
Control
4-0
4-4
8-0
8-4
12-0
12-4
압축시간(h)-압축정도(ml)

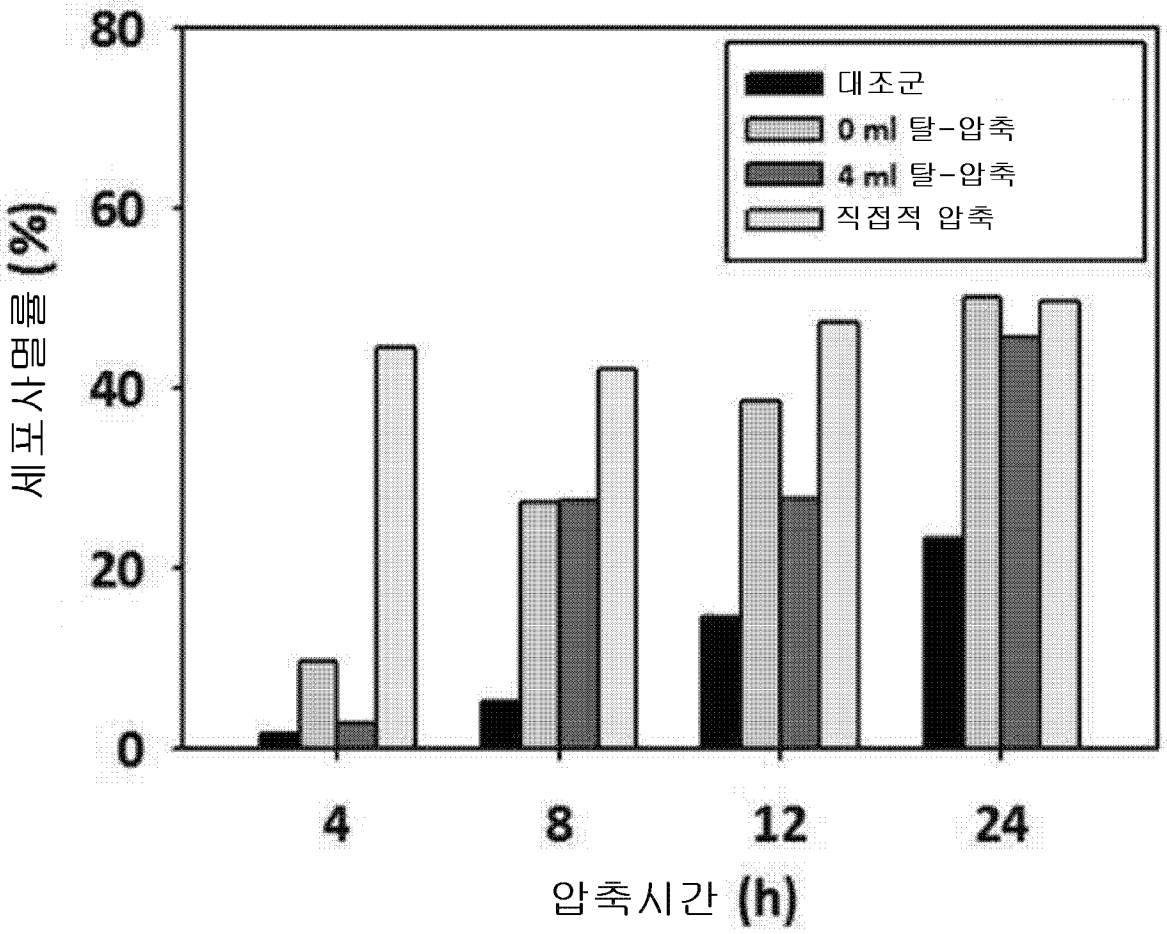
[도9]


CBLP에 비해 mRNA 발현량
ACCase
DGAT
LPAAT
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
6
5
4
3
2
1
0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
***
**
***
*
**
4
8
12
24
압축시간 (h)

[도10]


Control
Compression
a
0 h
4 h
8 h
12 h
24 h
10 μm
b
Control
0 ml
2 ml
4 ml
6 ml
8 ml

[도11]


80
60
40
20
0
세포사멸률 (%)
대조군
0 ml 탈-압축
4 ml 탈-압축
직접적 압축
4
8
12
24
압축시간 (h)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2017/007298

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12M 1/42(2006.01)i, C12P 7/64(2006.01)i, C12N 1/12(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12M 1/42; C12N 13/00; C12M 3/02; C12N 1/12; C12P 7/64; C12M 3/06

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above
Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: microalgae, stimulation, elastomer, polymer, cell, nozzle

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-1403464 B1 (KOREA INSTITUTE OF OCEAN SCIENCE & TECHNOLOGY) 11 June 2014 See claims 1-12 and figures 1, 2.	20
A		1-19
A	KR 10-2014-0115560 A (INHA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) 01 October 2014 See the entire document.	1-20
A	KR 10-2015-0054525 A (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) 20 May 2015 See the entire document.	1-20
A	KR 10-2016-0055301 A (KONKUK UNIVERSITY INDUSTRIAL COOPERATION CORP.) 18 May 2016 See the entire document.	1-20
PX	KR 10-2017-0028284 A (INHA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) 13 March 2017 See claims 1-19.	1-20

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
19 OCTOBER 2017 (19.10.2017)	**19 OCTOBER 2017 (19.10.2017)**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2017/007298

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHO, Myeong Kwon, "Mechanotransduction-induced Lipid Production System with High Robustness and Controllability for Microalgae", Scientific Reports - Nature, 09 September 2016, pages 1-10 See pages 1-3. ※ The above document is the published document declaring exceptions to lack of novelty by the applicant.	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2017/007298

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-1403464 B1	11/06/2014	NONE	
KR 10-2014-0115560 A	01/10/2014	NONE	
KR 10-2015-0054525 A	20/05/2015	NONE	
KR 10-2016-0055301 A	18/05/2016	NONE	
KR 10-2017-0028284 A	13/03/2017	NONE	

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2017/007298

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12M 1/42(2006.01)i, C12P 7/64(2006.01)i, C12N 1/12(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12M 1/42; C12N 13/00; C12M 3/02; C12N 1/12; C12P 7/64; C12M 3/06

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 미세조류, 자극, 탄성체, 고분자, 세포, 노즐

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-1403464 B1 (한국해양과학기술원) 2014.06.11 청구항 1-12 및 도면 1, 2 참조.	20
A		1-19
A	KR 10-2014-0115560 A (인하대학교 산학협력단) 2014.10.01 전문 참조.	1-20
A	KR 10-2015-0054525 A (서울대학교산학협력단) 2015.05.20 전문 참조.	1-20
A	KR 10-2016-0055301 A (건국대학교 산학협력단) 2016.05.18 전문 참조.	1-20
PX	KR 10-2017-0028284 A (인하대학교 산학협력단) 2017.03.13 청구항 1-19 참조.	1-20

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2017년 10월 19일 (19.10.2017)	2017년 10월 19일 (19.10.2017)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관
김선희
전화번호 +82-42-481-5405

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2017/007298

C (계속). 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	조명권 등, `Mechanotransduction-induced lipid production system with high robustness and controllability for microalgae (미세조류에 대해 높은 강인성과 제어성을 가지는 세포역학신호변환 유도 지질 생산)', Scientific Reports - Nature, 2016.09.09, 페이지 1-10 페이지 1-3 참조. ※ 위 문헌은 출원인이 신규성 상실의 예외로서 선언한 공지문헌임.	1-20

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2017/007298

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-1403464 B1	2014/06/11	없음	
KR 10-2014-0115560 A	2014/10/01	없음	
KR 10-2015-0054525 A	2015/05/20	없음	
KR 10-2016-0055301 A	2016/05/18	없음	
KR 10-2017-0028284 A	2017/03/13	없음	