



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0042410

(43) 공개일자 2015년04월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12M 1/12 (2006.01) C12M 3/06 (2006.01)

C12N 1/12 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0121009

(22) 출원일자 2013년10월11일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

심상준

서울 강남구 선릉로 221, 301동 803호 (도곡동, 도곡렉슬아파트)

임현석

서울 성북구 안암로 145, 자연캠퍼스 창의관 513호 (안암동5가, 고려대학교)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이처영, 장제환

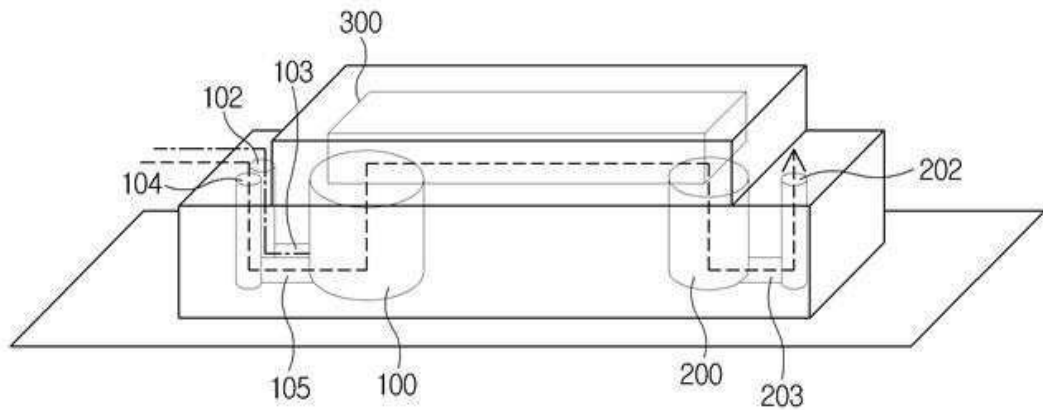
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 미세유체 지질 추출 장치 및 그 방법

(57) 요약

본원은 단세포 미세조류의 배양, 지질 축적 및 지질 추출을 신속하고 효율적으로 시행할 수 있는 장치 및 방법을 개시한다. 본원의 발명은 미세유체 내에서 세포 배양 및 성장의 실시간 모니터링이 가능하고, 배양액의 교환에 의한 세포내 지질의 축적, 유기 용매에 의한 세포의 파쇄 및 지질 추출을 통상적인 방법의 세포회수과정 없이 일련의 과정으로 용이하게 진행할 수 있어, 단세포 생물체의 성장성, 및 지질 함량 등의 효율적인 비교 분석 및 지질 고생산 균주의 선별에 있어 다양하게 활용할 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

곽호석

서울 성북구 안암로 145, 자연캠퍼스 창의관 513호
(안암동5가, 고려대학교)

김영환

서울 성북구 안암로 145, 자연캠퍼스 창의관 513호
(안암동5가, 고려대학교)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013-035971

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 (재)한국이산화탄소포집및처리연구개발센터

연구사업명 거대과학연구개발사업(Korea CCS 2020사업)

연구과제명 생물학적 이산화탄소 고속전환 유기 자원화 기술

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2013.06.01 ~ 2014.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

미세조류 또는 배지의 유입을 위해, 제1 유입관이 형성된 제1 유입부; 및
지질의 추출을 위한 유기 용매의 유입을 위한, 제2 유입관이 형성된 제2 유입부가 구비된 배양기;
생성된 지질의 배출을 위해 배출관이 형성된 배출부가 구비된 저장기; 및
상기 배양기 및 상기 저장기와 유체 소통가능하게, 적층구조로 연결된 마이크로 기둥 여과기를 포함하는 미세유체 지질추출 장치.

청구항 2

제 1항에 있어서,
상기 미세유체 지질추출 장치는 마이크로플레이트 리더를 추가로 포함하는것인, 미세유체 지질추출 장치.

청구항 3

제 1항에 있어서,
상기 미세유체 지질추출 장치는 펌프를 추가로 포함하고,
상기 펌프는 상기 제 2 유입부와 연결되는,
미세유체 지질추출 장치.

청구항 4

제 1항에 있어서,
상기 마이크로 기둥 여과기는, 실리콘, 유리 및 플라스틱 폴리머 중 어느 하나의 재질로 형성되는, 미세유체 지질추출 장치.

청구항 5

제 4항에 있어서,
상기 플라스틱 폴리머는, 사이클로올레핀 코폴리머 (cycloolefin copolymer, COC), 폴리디메틸 실록세인 (polydimethylsiloxane, PDMS), 폴리메틸메타크릴레이트 (poly-methylmethacrylate, PMMA), 폴리카보네이트 (polycarbonate, PC), 폴리아미드 (polyamide, PA), 폴리에틸렌 (polyethylene, PE), 폴리프로필렌 (polypropylene, PP), 폴리페닐렌 에테르 (polyphenylene ether, PPE), 폴리스티렌 (polystyrene, PS), 폴리옥시메틸렌 (polyoxymethylene, POM), 폴리에테르에테르케톤 (polyetheretherketone, PEEK), 폴리테트라프로오르 에틸렌 (polytetrafluoroethylene, PTFE), 폴리비닐클로라이드 (polyvinylchloride, PVC), 폴리비닐리덴 플루오라이드 (polyvinylidene fluoride, PVDF), 폴리부틸렌테레프탈레이트 (polybutyleneterephthalate, PBT), 불소화 에틸렌프로필렌 (fluorinated ethylenepropylene, FEP) 및 퍼플로알콕시알칸(perfluoralkoxyalkane, PFA)으로 이루어진 그룹에서 선택된 어느 하나인 것인, 미세유체 지질추출 장치.

청구항 6

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 따른 미세유체 지질추출 장치를 이용한 지질추출 방법으로, 상기 방법은, 미세조류 및 미세조류의 성장에 필요한 배지를 제 1 유입부 및 제 1 유입관을 통해 배양기로 유입하는 단계; 상기 배양기에서 미세조류를 배양하는 단계; 상기 미세조류의 지질을 축적하는 단계; 제 2 유입부 및 제 2 유입관을 통해 상기 배양기로 유기용매를 유입하여, 상기 미세조류를 파쇄하고, 상기 파쇄물 중 지질을 용해하는 단계; 및 상기 파쇄물 및 지질 용해물을 마이크로 기둥 여과기에서 여과하여, 상기 지질용액을 저장기로 유입하는 단계를 포함하는, 미세유체 장치를 이용한 미세조류의 지질 추출 방법.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 미세조류는 녹조류, 규조류, 홍조류, 편모류, 담록조류, 갈색 편모조류, 황녹색조류, 와편모류, 또는 남조류인, 미세유체 장치를 이용한 미세조류의 지질 추출 방법.

청구항 8

제 6 항에 있어서, 상기 방법은 상기 미세조류 및 배지를 유입하는 단계 전에 상기 미세조류를 $40 \text{ mol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 세기의 24시간 지속적 광조건에서 3일간 배양하는 전처리 단계를 추가로 포함하는 것인, 미세유체 장치를 이용한 미세조류의 지질 추출 방법.

청구항 9

제 6항에 있어서, 상기 배양은 $40 \text{ mol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 세기의 24시간 지속적인 광조건 및 23℃에서 4일간 배양하는 것인, 미세유체 장치를 이용한 미세조류의 지질 추출 방법.

청구항 10

제 6항에 있어서, 상기 지질 축적은 질소 결핍 배지를 주입하고, 상기 질소 결핍 배지 내에서 $40 \text{ mol photon m s}$ 세기의 24시간 지속적인 광조건 및 23℃에서 4일간 세포 내 지질 축적을 유도하는 것인, 미세유체 장치를 이용한 미세조류의 지질 추출 방법.

청구항 11

제 7항에 있어서,

상기 유기용매는 메탄올, 에탄올, 아이소프로판올인, 미세유체 장치를 이용한 미세조류의 지질 추출 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본원은 미세유체 장치를 이용한 미세조류의 배양, 지질축적 및 추출 기술에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 박테리아, 효모, 및 미세조류를 포함하는 여러 단세포 생물체는 농업, 축산, 수산, 의약 및 자원 분야에서 다양한 목적으로 이용된다. 예를 들면 박테리아 및 효모는 의약품 단백질 발현에 널리 사용되며, 특히 미세조류는 광에너지와 이산화탄소 및 무기물질로부터 바이오디젤로 전환이 가능한 중성지질을 다량 생산할 수 있는 능력이 있어 근래 화석연료 사용량의 급증으로 인한 에너지자원 고갈문제 및 온실가스 배출에 따른 지구온난화 문제를 해결할 수 있는 대안의 하나로 주목받고 있다.

[0003] 미세조류는 클로로필, 카로티노이드, 파이크빌린스 등과 같은 색소를 함유하고 있으며 광합성을 통해 세포성장 및 이에 필요한 유기물질을 합성할 수 있는 단세포성 조류를 미세조류 (microalgae)라 하며, 대부분의 식물성 플랑크톤이 이에 속한다. 미세조류는 식물에 비해 성장속도가 빠르고 광에너지와 이산화탄소 및 무기물질로부터 바이오디젤로 전환이 가능한 중성지질을 다량 생산할 수 있는 능력이 있어 근래 화석연료 사용량의 급증으로 인한 에너지자원 고갈문제 및 온실가스 배출에 따른 지구온난화 문제를 해결할 수 있는 대안의 하나로 주목받고 있다. 또한, 미세조류는 사용 가능한 오일 성분이 바이오매스의 30~70%에 달하므로 기존 작물에 비해 높은 연료 생산성을 나타낸다.

[0004] 이러한 미세조류의 효율적 이용을 위해, 배지 최적화, 최적 반응기 설계, 대사공정과 생산물 정제 등을 위한 연구가 필요하다. 한편, 현재 미세조류의 지질 추출법은 독성이 강한 클로로포름 등의 유기용매를 사용하고 있다.

[0005] 대한민국 등록특허 제10-0320786호는 미세조류의 지질의 용매추출법에 관한 것으로, 미세조류의 배양액을 침전시키고 원심 분리하여 회수한 미세조류를 클로로포름과 메탄올의 혼합용매에 분산시켜 탄화수소를 회수하는 방법을 개시하고 있다.

[0006] 이러한 용매 추출법은 유기용매에 대한 높은 내구성을 지닌 유리등의 재료만이 사용가능하며 이에 따른 고비용 및 복잡한 제작공정 등의 제약이 있다. 또한 탈수과정 및 추출과정에서 미세조류가 파괴되어 유용한 바이오연료인 탄화수화물, 세포내 단백질 등의 성분이 유출 및 소실되어 재배양을 하거나 바이오매스를 재사용하는데 어려움이 있다.

[0007] 따라서, 미세조류로부터 생산되는 지질의 효율적 분석을 위해 단세포 미세조류의 배양, 지질 축적 및 지질 추출을 신속하고 효율적으로 수행할 수 있는 시스템 및 방법 개발이 요구된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 미세조류로부터 생산되는 지질의 효율적 분석을 위해 세포의 회수과정 없이 단세포 미세조류의 배양, 지질 축적 및 지질 추출을 신속하고 효율적으로 수행할 수 있는 방법 및 장치를 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0009] 한 양태에서 본원은 미세조류 또는 배지의 유입을 위해, 제1 유입관이 형성된 제1 유입부; 및 지질의 추출을 위한 유기 용매의 유입을 위한, 제2 유입관이 형성된 제2 유입부가 구비된 배양기; 생성된 지질의 배출을 위해 배출관이 형성된 배출부가 구비된 저장기; 및 상기 배양기 및 상기 저장기와 유체 소통가능하게, 적층구조로 연결된 마이크로 기동 여과기를 포함하는 미세유체 지질추출 장치에 관한 것이다.

- [0010] 본원에 따른 장치는 미세유체 시스템 내의 배양기에서 단세포 미세조류의 배양 및 지질 축적 상태, 흡광도 및 지질염색시약의 형광강도의 측정을 통한 미생물의 실시간 모니터링에 사용될 수 있으며, 이를 위해 마이크로플레이트 리더기를 추가로 포함할 수 있다.
- [0011] 본원에 따른 장치는 펌프를 추가로 포함하고, 상기 펌프는 상기 제1 및/또는 제 2 유입부와 연결될 수 있다.
- [0012] 본원에 따른 장치는 마이크로기둥으로 이루어진 여과기를 포함하며, 이는 실리콘, 유리 및 플라스틱 폴리머 중 어느 하나의 재질로 형성될 수 있다.
- [0013] 다른 양태에서 본원은 본원에 따른 미세유체 지질추출 장치를 이용한 지질추출 방법에 관한 것으로 상기 방법은, 미세조류 및 미세조류의 성장에 필요한 배지를 제 1 유입부 및 제 1 유입관을 통해 배양기로 유입하는 단계; 상기 배양기에서 미세조류를 배양하는 단계; 상기 미세조류의 지질을 축적하는 단계; 제 2 유입부 및 제 2 유입관을 통해 상기 배양기로 유기용매를 유입하여, 상기 미세조류를 파쇄하고, 상기 파쇄물 중 지질을 용해하는 단계; 및 상기 파쇄물 및 지질 용해물을 마이크로 기둥 여과기에서 여과하여, 상기 지질용액을 저장기로 유입하는 단계를 포함한다.
- [0014] 본원에 따른 방법 및 장치는 미생물 특히 광합성 미생물, 예를 들면 미세조류의 배양 및 이로부터의 지질 추출에 사용될 수 있으며, 녹조류, 규조류, 홍조류, 편모류, 담록조류, 갈색 편모조류, 황녹색조류, 와편모류, 또는 남조류를 포함한다.

발명의 효과

- [0015] 본 발명은 단세포 생물의 배양 및 지질 추출을 미세유체 시스템을 이용하여 효과적으로 수행할 수 있는 방법으로, 세포 배양 및 지질축적과정의 실시간 모니터링이 용이하고, 유기 용매에 의한 세포의 파쇄 및 미세유체 장치내의 마이크로 기둥 여과기를 이용한 지질 추출의 연속적 진행이 가능하여, 단세포 생물체의 성장성 및 지질 함량 등의 신속한 분석 및 지질 고생산 균주의 선별에 유용하게 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0016] 도 1은 본원의 일 구현예에 따른 미세조류의 배양 및 지질 추출을 위한 미세유체 장치의 모식도이며, 화살표는 유체의 흐름을 나타낸다.
- 도 2a는 본원의 일 구현예에 따른 미세유체 시스템의 배양기, 저장기, 유입부, 유입관, 배출부 및 배출관의 횡단면도이다.
- 도 2b는 본원의 일 구현예에 따른 미세유체 지질 추출장치의 평면도 및 마이크로 기둥 여과기의 상세구조이다.
- 도 3a는 본원의 일 구현예에 따른 미세유체 시스템에 적합한 용매선별 실험 결과이다.
- 도 3b는 본원의 일 구현예에 따른 지질 추출을 위한 미세유체 시스템 구동 사진이다.
- 도 4a는 본원의 일 구현예에 따른 미세유체 장치의 배양기 내에서 배양된 미세조류의 20배 광학 현미경 사진이다.
- 도 4b는 본원의 일 구현예에 따른 미세유체 시스템의 마이크로 기둥의 형태를 보여주는 20배 광학 현미경 사진이다.
- 도 5a는 본원의 일 구현예에 따른 미세유체 시스템의 세포 배양단계에서 시간에 따른 미세조류의 성장 그래프이다.
- 도 5b는 본원의 일 구현예에 따른 미세유체 시스템의 세포 배양단계에서 시간에 따른 미세조류의 세포수를 측정 한 그래프이다.
- 도 5c는 본원의 일 구현예에 따른 미세유체 시스템의 이용한 지질 축적 단계에서 시간에 따른 세포의 지질 축적량을 측정한 그래프이다.
- 도 6a는 용매의 종류에 따라 추출된 지방산 종류 및 함량을 나타난 그래프이다.

도 6b는 본원의 일 구현예에 따른 미세유체 시스템을 이용하여 추출된 지질 의 사진이다.

도 6c는 본원의 일 구현예에 따른 미세유체 시스템을 이용하여 추출된 지질의 Thin Layer Chromatography (TLC) 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 본원은 미세유체 시스템을 이용하여 단세포 생물체내의 지질을 추출할 수 있다는 발견에 근거한 것으로, 구체적으로 미세조류의 배양, 지질 축적, 세포 파쇄 및 지질 추출을 미세유체 시스템내에서 일련의 과정을 통해 신속하고 효율적으로 수행할 수 있음을 발견하였다.
- [0018] 이하 본원의 장치에 포함된 구성 및 그에 따른 명칭을 예로 들어 설명하나, 이에 한정되는 것은 아니며, 발명을 이해하고 해석함에 있어서는 상응하는 구성으로 해석되어야 한다.
- [0019] 따라서 한 양태에서 본원은 제 1 유입관(103)이 형성된 제 1 유입부(102); 및 지질의 추출을 위한 유기 용매의 유입을 위한, 제 2 유입관(105)이 형성된 제 2 유입부(104)가 구비된 배양기(100); 생성된 지질의 배출을 위해 배출관(203)이 형성된 배출부(202)가 구비된 저장기(200); 및 상기 배양기 및 상기 저장기와 유체 소통가능하게, 적층구조로 연결된 마이크로 기둥 여과기(300)를 포함하는 미세유체 지질추출 장치에 관한 것이다.
- [0020] 본원의 미세유체 지질추출 장치에 포함되는 각 구성은 광투과성이 있는 투명한 재질로, 사용되는 미세조류에 대한 독성이 없고 생물활성에 필요한 물질전달이 용이하며, 미세조류의 이동을 방해하지 않는 재질, 또는 상기 특징을 갖도록 전 처리된 재질로 제작되는 것이 바람직하다. 이러한 물질로는 예를 들면 PMMA(Poly(methyl methacrylate)), PS(Polystyrene), 또는 PDMS (polydimethylsiloxane) 등을 들 수 있으나 이로 제한하는 것은 아니다.
- [0021] 도 1을 참조하면, 본원에 따른 장치에 포함되는 배양기(100)는 지질 추출의 대상이 되는 미생물, 예를 들면 미세조류의 배양 및 세포내 지질축적을 위한 것으로, 예를 들면 미세조류의 크기, 특성 및 사용되는 개체 수에 따라 다양한 모양, 크기 및/또는 재질로 형성될 수 있다. 상기 배양기는 미세조류 및 배지를 유입하기 위한 제 1 유입부(102) 및 유기용매를 유입하기 위한 제 2 유입부(104)를 포함하며, 상기 미세조류 및 배지 또는 유기용매가 각각의 유입부로 유입되어, 미세조류 및 배지는 제 1 유입관(103), 유기용매는 제 2 유입관(105)을 통해 배양기에 도달할 수 있다. 본원에 따른 일 구현예에서는 도 2a와 같은 모양 및 크기로 제작될 수 있으나 이로 제한하는 것은 아니다.
- [0022] 도 2b를 참조하면, 본원의 장치는 상기 배양기와 적층구조로 연결되는 마이크로 기둥 여과기(300)를 포함한다. 마이크로 기둥 여과기는 마이크로 기둥(302)이 일정한 간격으로 배열되어 있으며, 지질을 포함하는 배양액의 여과에 사용된다. 배양기내의 미세조류에 유기용매를 유입하여, 세포를 파쇄한 후, 이에 포함된 지질을 유기용매에 용해하여, 기둥 여과기로 유입시키면 세포 파쇄물은 마이크로 기둥 사이에 잔류하게 되며, 지질용해물만 여과되어 상기 마이크로 여과기와 연결되어 있는 저장기(200)에 도달하게 된다.
- [0023] 상기 마이크로 기둥 여과기는, 실리콘, 유리 및 플라스틱 폴리머 중 어느 하나의 재질로 형성된다. 본원의 일 구현 예에서 상기 플라스틱 폴리머는, 사이클로올레핀 코폴리머 (cycloolefin copolymer, COC), 폴리디메틸 실록세인 (polydimethylsiloxane, PDMS), 폴리메틸메타크릴레이트 (poly-methylmethacrylate, PMMA), 폴리카보네이트(polycarbonate, PC), 폴리아미드 (polyamide, PA), 폴리에틸렌 (polyethylene, PE), 폴리프로필렌 (polypropylene, PP), 폴리페닐렌 에테르 (polyphenylene ether, PPE), 폴리스티렌 (polystyrene, PS), 폴리옥시메틸렌 (polyoxymethylene, POM), 폴리에테르에테르케톤(polyetheretherketone, PEEK), 폴리테트라프로오르에틸렌 (polytetrafluoroethylene, PTFE), 폴리비닐클로라이드 (polyvinylchloride, PVC), 폴리비닐리덴 플로라이드 (polyvinylidene fluoride, PVDF), 폴리부틸렌테레프탈레이트 (polybutyleneterephthalate, PBT), 불소화 에틸렌프로필렌 (fluorinated ethylenepropylene, FEP) 및 퍼플로알콕시알칸(perfluoralkoxyalkane, PF A)으로 이루어진 그룹에서 선택된 어느 하나인 것이나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0024] 본원에 따른 일 구현예에서 마이크로 기둥 여과기의 기둥은 도 2b 및 도 4b를 참조하면 가로 10 μ m, 세로 10 μ m, 높이 5 μ m인 사각기둥의 형태이며, 각 기둥의 간격은 2 μ m로 제작하였으나, 이는 예시적인 것으로 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0025] 본원에 따른 저장기는 여과기에서 도달된 지질 추출액을 저장하는 위치이며 상기 저장기와 연결된 지질 배출관

(203) 및 배출부(202)를 통해 지질 추출액은 장치 외부로 배출 될 수 있다.

- [0026] 본원의 장치는 투명하기 때문에 광투과가 가능하여 광조사가 필요한 단세포 생물체의 배양이 가능하고, 도 3b를 참조하면 단세포 생물체의 현미경적 관찰을 통해 배양 상태의 실시간 모니터링이 가능하다. 또한 본원의 장치는 마이크로 플레이트 리더를 추가로 포함할 수 있다. 일 구현예로 미세유체 시스템 내의 배양기에서 단세포 미세조류의 배양 및 지질 축적 상태를 마이크로플레이트 리더기를 이용한 흡광도 및 지질염색시약의 형광강도의 측정을 통해 실시간으로 모니터링할 수 있다.
- [0027] 본원에 따른 장치의 모양, 및 크기는 특정 형상으로 제한되는 것은 아니며, 일 구현예에서는 포토리소그래피로 제작한 몰드를 통해 PDMS를 이용하여 제 1 유입부, 제 1 유입관, 제 2 유입부, 제 2 유입관, 배출부, 배출관, 배양기 및 저장기가 위치하는 하층부 및 마이크로 기둥 여과기가 위치하는 상층부를 플라즈마처리를 통해 적층하여 제작될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0028] 나아가, 본원에 따른 미세유체 지질추출 장치의 유체가 소통될 수 있도록 형성되어 단세포 생물체, 배지, 유기용매 주입 및 지질 추출에 방해되지 않도록 저항성이 최소화 할 수 있는 구조 및 크기로 제작된다. 일 구현예에서는 도 2a와 같이 기재된 것과 같은 크기를 가질 수 있으나, 이는 예시적인 것으로 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0029] 도 3b는 본원의 미세유체 지질추출 장치의 구동을 보여주는 사진으로, 본원의 장치는 배양액과 같은 유체의 주입을 위한 펌프를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들면 주사기 펌프가 사용될 수 있으며, 이는 미세유체 지질추출장치의 제 2 유입부와 연결되며, 유기용매를 일정한 속도로 장치내로 유입하고, 장치 내부의 용액에 압력을 가해 지질용해액이 마이크로기둥 여과기를 거쳐 배출부로 도달될 수 있도록 한다.
- [0030] 또 다른 측면에서 본원은 상술한 본원의 장치를 이용한 지질추출의 방법에 관한 것이다. 본원의 따른 방법은 미세조류 및 미세조류의 성장에 필요한 배지를 제 1 유입부 및 제 1 유입관을 통해 배양기로 유입하는 단계; 상기 배양기에서 미세조류를 배양하는 단계; 상기 미세조류의 지질을 축적하는 단계; 제 2 유입부 및 제 2 유입관을 통해 상기 배양기로 유기용매를 유입하여, 상기 미세조류를 파쇄하고, 상기 파쇄물 중 지질을 용해하는 단계; 및 상기 파쇄물 및 지질 용해물을 마이크로 기둥 여과기에서 여과하여, 상기 지질용액을 저장기로 유입하는 단계를 포함한다.
- [0031] 본원에서 사용된 용어 "미세조류"는 광합성 색소를 가지고 광합성을 하는 단세포생물들에 대한 통칭이며, 한 구현예에서, 미세조류는 녹조류, 규조류, 홍조류, 편모류, 담록조류, 갈색 편모조류, 황녹색조류, 와편모류, 또는 남조류인, 예를 들면 녹조류 (*Chlorella*, *Dunaliella*, *Scenedesmus*, *Haematococcus*, *Nannochloris* 등), 규조류 (*Skeletonema*, *Thalassiosira*, *Phaeodactylum*, *Chaetoceros* 등), 홍조류 (*Porphyridium cruentum*, *Galdieria* 등), 편모류 (*Isochrysis*, *Pavlova* 등), 담록조류 (*Tetraselmis*, *Pyramimonas*), 갈색 편모조류 (*Chlamydomonas*, *Rhodomonas*, *Chroomonas* 등), 황녹색조류 (*Olistodiscus* 등), 와편모류 (*Cryptocodinium*, *Alexandrium*, *Gymnodinium*, *Chattonella*, *Karenia* 등), 남조류 (*Spirulina*, *Synechococcus*, *Synechocystis*, *Cyanidium* 등)를 들 수 있으나, 이로 제한하는 것은 아니다. 일 구현예에서는 갈색 편모조류, 특히 *Chlamydomonas* spp., *Rhodomonas* spp., *Chroomonas* spp., 더욱 특히 클라미도모나스 레인하르티아이 (*Chlamydomonas reinhardtii*)가 사용되나, 이로 제한하는 것은 아니다.
- [0032] 본원 방법에서 단세포 생물체를 지속적 광조건에서 배양한 후, 상기 단세포 생물체를 암조건에서 배양하는 전처리 단계를 추가로 포함할 수 있다. 전처리 단계는 지속적인 광조건에서 배양함으로써 세포의 활성이 가장 우수한 대수기 상태로 유지하기 위한 것이다. 즉 전처리 단계는 지속적 광조건은 광합성을 통해 성장하는 미세조류가 활동성이 가장 우수한 대수기 상태로 될 수 있는 광량이면 충분한 것이며, 특별히 한정되는 것은 아니다. 또한 대수기에 보다 신속한 도달을 위해 광이 지속적으로 조사될 수 있다. 이러한 조건을 만족하는 한 광량 및 조사 시간은 한정되지 않으나, 예를 들면 지속적 광조건은 예를 들면 약 $40 \text{ mol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 세기의 광을 일정시간 예를 들면 약 12 내지 24시간 동안 조사하는 것이나, 이로 제한하는 것은 아니다.
- [0033] 또한 전처리 단계의 배양은 세포 성장 주기의 최적의 상태인 대수증식기(exponential phase) 까지 배양한 후 다음 단계에서 사용된다. 단세포 생물체의 생장은 크게 유도기 (lag phase: induction phase); 대수증식기 (exponential phase, log phase, growth phase); 정지기 (stationary phase); 및 사멸기 (death phase)로 구성되며, 당업자라면 대수증식기를 판별할 수 있을 것이다.
- [0034] 본원의 한 구현예에서는 상기 전처리 후 미세조류는 일정 세포 농도 예를 들면 $3.510^4 \text{ cells ml}^{-1}$ 로 희석하여

500 μ l를 상기 미세유체 지질 추출 장치의 제 1 유입부로 배양기로 유입하였다. 도 4a는 배양기로 유입된 미세조류의 사진이다. 배양기로 유입된 미세조류는 40 mol photon $m^{-2} s^{-1}$ 세기의 24시간 지속적인 광조건 및 23℃ 에서 4일간 배양하였으나, 이로 제한하는 것은 아니다.

[0035] 본원에서 사용된 용어 "지질"이란 생체를 구성하는 물질 중에서 물에는 녹지 않고, 에테르클로로폼벤젠석유 등의 유기용매에 잘 녹는 것으로서, 그 성분이나 화학구조에 따라 단순지질과 복합지질로 나눌 수 있다. 그 종류로는 중성지방, 글리세롤인지질, 글리세롤당지질, 카로티노이드, 및 스테로이드 등이 있다. 특히 미세조류의 지질은 중성지방을 많이 포함하고 있고, 석유계 기름과 유사한 분자구조를 가지고 있으며, 기름함유량은 콩의 10배, 땅콩의 7~8배에 달한다.

[0036] 본원의 한 구현예에서 미세 조류의 지질 축적은 상기 배양단계의 배지를 질소 결핍배지로 교환하고, 상기 질소 결핍 배지 내에서 예를 들면 40 mol photon $m^{-2} s^{-1}$ 세기의 24시간 지속적인 광조건 및 23℃ 에서 4일간 세포 내 지질 축적이 유도될 수 있다. 미세조류의 경우 질소결핍 상태에 노출되면 세포막을 분해하여 지질을 생산한다. 지질이 축적되는 과정은 나일 레드 (Nile Red)로 염색 후 Emission 530 nm, Excitation 580 nm의 조건에서 마이크로플레이트 리더를 이용하여 (Infinite 200 Pro, Tecan) 형광을 측정함으로써 미세조류의 지질축적 상태를 확인할 수 있다.

[0037] 본원의 방법에 따라 지질축적된 미세조류는 유기용매를 이용하여 세포파쇄 및 미세조류의 지질성분을 용해하는 단계를 포함한다. 본원에서 사용된 용어 "세포파쇄"란, 세포의 표면막이 기능을 상실하여 세포 내용물이 수중에 분산 또는 용해하는 현상으로, 물리적인 방법과 비물리적인 예를 들면 화학적 방법으로 나눌 수 있다. 본원에서는 유기용매를 이용한 화학적 방법이 사용되며, 유기용매는 본원에 따른 장치와 화학적 작용을 하지 않아 변형을 유발하지 않는 것으로, 도 3a에 나타난 바와 같이 메탄올, 에탄올 또는 아이소프로판올과 같은 유기용매가 사용될 수 있으나 이로 제한되는 것은 아니다.

[0038] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위해서 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐 본 발명이 하기의 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0039] <실시예>

[0040] 실시예 1 균주 및 배지

[0041] 본 발명에서 사용된 균주는 Chlamydomonas Resource Center에서 구입한 것으로 *Chlamydomonas reinhardtii* CC-503(cw92 mt+)이다. 이 균주는 가장 잘 알려진 미세조류의 종으로써 세포벽이 없거나 얇은 것을 특징으로 하며, 본 발명의 효과를 검증하고자 사용하였다.

[0042] 본 실험에 균주 배양을 위해 사용된 배지는 TAP 배지이고, 세포 내 지질 축적을 위해 사용한 배지는 TAP-N 배지이다. 이들의 구성성분은 [표 1]에 나타내었으며, TAP-PN 배지는 TAP 배지에서 사용되는 TAP salt 내 NH_4Cl 15.0g 대신 KCl 21.0g을 넣어준 배지이다.

[0043] [표 1]

TAP 배지	
성분	함량 (1L water)
TAP salts (1L water)	25 ml
NH ₄ Cl 15.0 g	
MgSO ₄ · 7H ₂ O 4.0 g	
CaCl ₂ · 2H ₂ O 2.0 g	
Phosphate solution (100 ml water)	0.375 ml
K ₂ HPO ₄ 28.8 g	
KH ₂ PO ₄ 14.4 g	
Hutner's trace elements	1.0 ml
EDTA disodium salt 50 g (250 ml water)	
ZnSO ₄ · 7H ₂ O 22 g (100 ml water)	
H ₃ BO ₃ 11.4 g (200 ml water)	
MnCl ₂ · 4H ₂ O 5.06 g (50 ml water)	
CoCl ₂ · 6H ₂ O 1.61 g (50 ml water)	
CuSO ₄ · 5H ₂ O 1.57 g (50 ml water)	
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O 1.10 g (50 ml water)	
FeSO ₄ · 7H ₂ O 4.99 g (50 ml water)	
Tris base	2.42 g
Glacial acetic acid	1.0 ml

[0044]

[0045] 실시예 2 미세조류 배양 및 미세유체 장치 제작

[0046]

미세유체 장치 구성의 하층부는 실리콘 기판에 음성감광제 SU-8 50을 회전도포한 후, 디자인된 마스크를 덮고 자외선 노광기를 이용하여 자외선에 노출시켜 포토리소그래피(photo-lithography)를 통해 제작되었으며, 고분자 PDMS (Polydimethylsiloxane)와 경화제를 10:1의 비율로 혼합하여 포토리소그래피로 제작된 SU-8 몰드위에 제작하였다. 완성된 PDMS 미세유체 장치는 플라즈마 처리를 통해 커버 글라스와 결합시켰다. 본 장치 구성의 상층부 또한 실리콘 기판에 음성감광제 SU-8 50을 사용하여 회전도포 한 후, 디자인된 마스크를 덮고 자외선 노광기를 이용하여 자외선에 노출시켜 포토리소그래피(photo-lithography)를 통해 제작되었으며, 고분자 PDMS (polyimethylsiloxane)와 경화제를 10:1의 비율로 혼합하여 포토리소그래피로 제작된 SU-8 몰드위에 제작하였다. 완성된 PDMS 미세유체 장치는 플라즈마 처리를 통해 하층부와 결합시켰다. 이후 유체를 흘려 넣어줄 관과 연결하였다. 완성된 장치의 개략도는 도 1과 같다.

[0047]

상기 장치는 도 2a에서 보는 바와 같이, 하층부는 배양과 추출에 필요한 배양기를 두었고, 이는 지름 8mm의 크기를 가진다. 또한 반대편에 추출액이 모일 수 있도록 6mm의 지름을 가지는 저장기를 제작하였다. 유입부 및 배출부는 각각 2mm의 지름을 가지며 각각의 유입부는 흐름의 역류를 방지하기 위하여 꺾임형의 유입관으로 연결하였으며, 세포의 배양에 필요한 배양액을 넣어주는 유입부를 제 1 유입부, 유기용매를 주입하는 유입부를 제 2 유입부로 각기 구분해 두었다. 또한 도 2b에서 볼 수 있듯이, 상층부는 배양하고 있는 미세조류가 반대쪽 저장기로 넘어가지 않도록 하기 위해서 마이크로 기둥구조를 상층부의 관 전체에 배치해 두었으며, 기둥은 가로 세로 10 μm, 높이 5 μm을 가지는 사각형의 형태이며, 각각의 사각기둥은 서로 2 μm 간격으로 상층부 전체에 배열하여 세포 및 세포파쇄물에 대한 여과가 가능하도록 제작하였다.

[0048]

실시예 3 미세조류의 배양 및 세포 내 지질 축적 유도

[0049]

Chlamydomonas reinhardtii (CC-503)을 미세유체 장치 내에서 초기 미세조류의 농도를 $3.2510 \times 10^3 \text{ cells ml}^{-1}$ 의 농도로 TAP 배지에 희석하여 500 μl를 넣은 후 제 1 및 제 2 유입부를 tape로 막아 세지 않도록 한 후, 24 시간 광을 주는 조건으로 하여 23℃에 온도를 맞추어 배양하였다. 이후 미세조류의 성장을 마이크로플레이트 리더기(Infinite 200 Pro, Tecan)를 이용하여 800nm의 파장에서 흡광도를 측정함으로 써 확인하였다. 미세조류 배양 4일째 미세유체 장치 내에 TAP-N배지를 주입하여 지질축적을 유도하였고, 지질이 축적되는 과정은 Nile Red로 염색 후 Emission 530 nm, Excitation 580 nm의 조건에서 마이크로플레이트 리더를 이용하여 형광을 측정함으로써 확인하였다. 도 5a에서 확인 할 수 있듯이 세포를 분주해 준 초기에는 세포의 농도가 낮아 시간에 따라

증가하는 흡광도가 낮지만 도 5b를 보면 실제 증가하는 세포의 수는 유도기 (lag phase)를 지남에 따라 급격하게 증가하는 것을 확인 할 수 있으며 대수증식기 (exponential phase)에 들어가는 2일차와 3일차에서 세포의 수가 급격히 증가하였음을 확인할 수 있다. 그리고 도 5a 및 5b에서 확인 할 수 있듯이 4일차를 넘어서 5일차가 진행되면서 실제 세포의 수가 감소하는 것으로 나타났으며, 이는 4일차에 배지를 교환해 주는 작업을 하는 것이 실제 세포가 가장 많은 상태에서 지질 축적을 유도할 수 있다는 것을 나타낸다. 또한 도 5c에서는 지질을 축적하도록 유도한 뒤에 매일 같은 시간에 측정하여 지질이 얼마나 축적되고 있는 지를 확인하였으며 4일 차에 최고 점에 도달한 후 5일차로 진행되면 지질의 축적속도가 줄어드는 것을 확인 할 수 있다. 이를 통해 4일간의 지질 축적 유도가 가장 적합하다는 것을 확인하였다.

[0050]

실시에 4 지질의 추출 및 분석

[0051]

통상적으로 지질 추출에 널리 쓰이는 클로로포름, 헥산 등의 유기용매가 PDMS를 팽윤 및 용해시키는 문제가 존재하므로 이를 해결하기 위해 지질 추출능이 있으면서 PDMS에 영향이 미미한 에탄올, 아이소프로판올 등, 알코올 용매를 70% 수용액 상태로 만들어 미세조류 세포로부터 지질 추출을 시험해본 결과, 60℃ 이상 가열된 조건에서 지질 추출이 가능함을 확인하였다. 또한 이러한 알코올 수용액을 PDMS로 제작된 미세유체 장치에 유입시켜 장시간 노출시키더라도 미세유체 채널 및 구조에 영향을 미치지 않고 작동함을 도 3a처럼 확인하였다. 이를 바탕으로 70% 에탄올, 70% 아이소프로판올을 이용하여 미세조류로부터 지질추출을 하였다. 이들 용매를 정량 주사기 펌프 (PHD 2000 Advanced Syringe, Harvard Apparatus, USA)를 이용하여 미세유체 장치 내에 주입하였고 추출능을 보다 높이고자 60℃의 온도를 유지시켜 주었다. 이후 TLC (Thin layer chromatography, sigma aldrich TLC plate)와 GC (Gas Chromatography, agilent technologies 7890A GC system)를 통해 분석을 하여 실제 지질의 종류 및 각 지질 성분이 얼마나 추출되었는가를 확인하였다. TLC 분석에 필요한 표준 시료는 글리세릴 트리올리레이트(C18:0), 20 μ l를 사용하였으며 각 시료로부터 추출된 지질시료들과 함께 TLC 플레이트에 로딩한 후 전개용매 (헥산: 디에틸에테르: 아세트산, 80:30:1)가 담긴 TLC 전개조에 TLC 플레이트를 넣어 전개하였다. 전개 후 TLC 플레이트는 요오드 염색을 이용하여 가시화하였다. GC 분석을 위해, 중성지질인 트리아실글리세롤에 해당하는 영역을 끊어내어 1 ml의 헥산에 용해시킨 후 산촉매에 의한 지방산메틸에스테르로 전환하여 가스크로마토그래피를 이용하여 정량분석하였다.

[0052]

도 6a 및 b에 나타난 바와 같이 70% 에탄올, 70% 아이소프로판올에서 추출된 지질성분 분석결과 통상적으로 널리 쓰이는 클로로포름/메탄올 추출 성분과 비교하여 유사한 결과를 보임으로써 본원에 따른 미세유체 장치를 이용한 지질 추출방법이 미세조류에 지질 추출에 효과적으로 적용될 수 있음을 확인하였다. 추출된 지질의 종류는 다음과 같다: C14:0 (미리스틴산), C16:0 (팔미트산), C18:0 (스테아르산), C18:1 (올레산), C18:2 (리놀레산) 및 C18:3 (알파리놀레산). 상기 추출된 지질 중 미세조류가 가장 많이 축적하는 16개의 탄소를 포함하는 포화지방산인 C16:0(팔미트산)을 이 가장 많이 추출되었다. 또한 도 6c에 나타난 바와 같이 70% 에탄올을 이용하여 미세유체 장치에서 추출된 지질에서 바이오디젤로 활용되는 중성지질, 트리아실글리세롤에 해당하는 성분이 추출됨을 TLC 분석결과 확인하였다.

[0053]

이상에서 본원의 예시적인 실시예에 대하여 상세하게 설명하였지만 본원의 권리범위는 이에 한정되는 것은 아니고 다음의 청구범위에서 정의하고 있는 본원의 기본 개념을 이용한 당업자의 여러 변형 및 개량 형태 또한 본원의 권리범위에 속하는 것이다.

[0054]

본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 본 명세서에 참고문헌으로 기재되는 모든 간행물의 내용은 본 발명에 도입된다.

부호의 설명

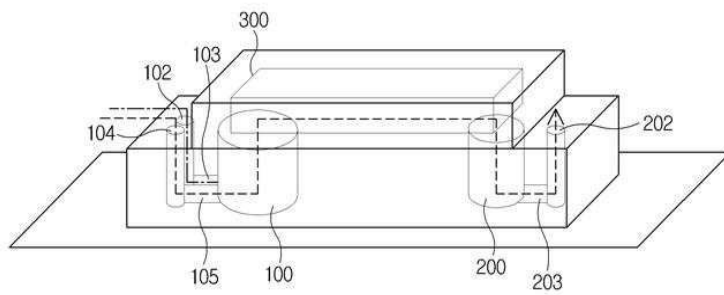
[0055]

100. 배양기
102. 제 1 유입부
103. 제 1 유입관

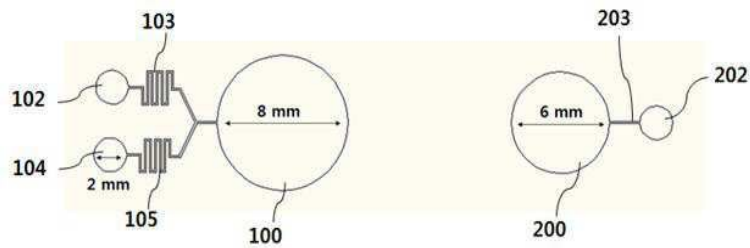
- 104. 제 2 유입부
- 105. 제 2 유입관
- 200. 저장기
- 202. 지질 배출부
- 203. 지질 배출관
- 300. 마이크로 기둥 여과기
- 302. 마이크로 기둥

도면

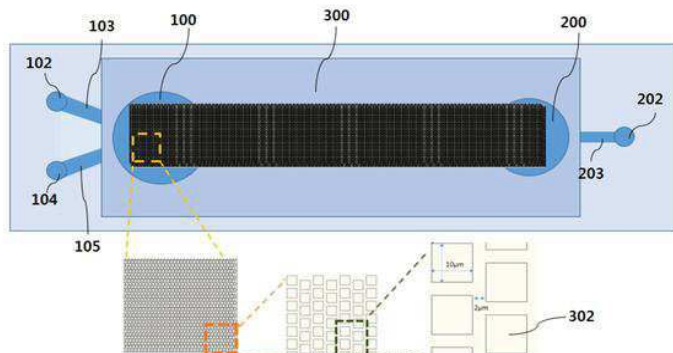
도면1



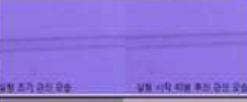
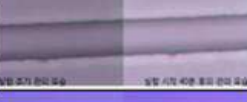
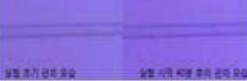
도면2a



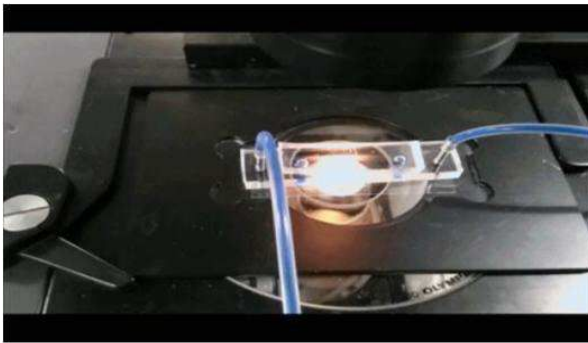
도면2b



도면3a

용매	미세유체기기 전반적인 모습 (용액에 담근 뒤 40배 확대 모습)	미세유체기기 상의 채널
Bligh-Dyer법 (클로로포름 메탄올 2:1비율)		
70% 메탄올		
70% 에탄올		
70% 아이소프로판올		

도면3b



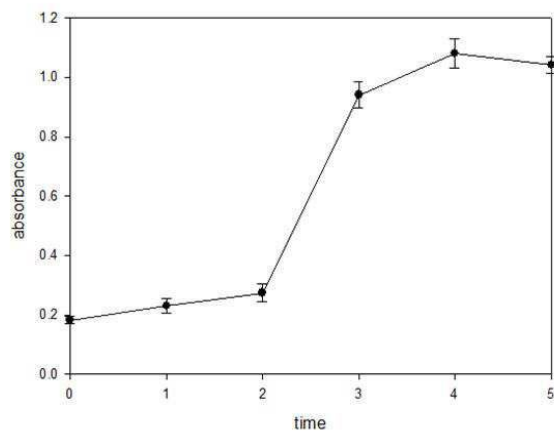
도면4a



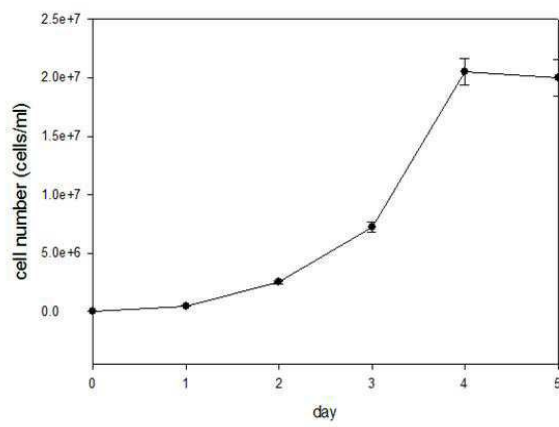
도면4b



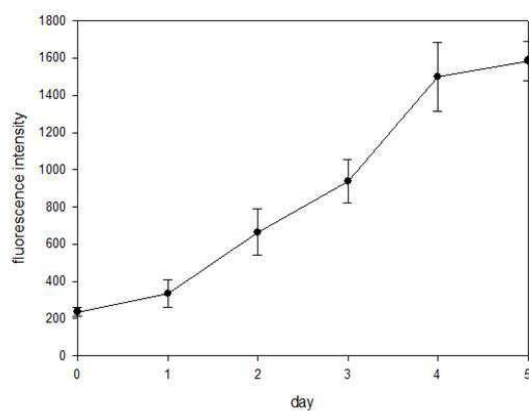
도면5a



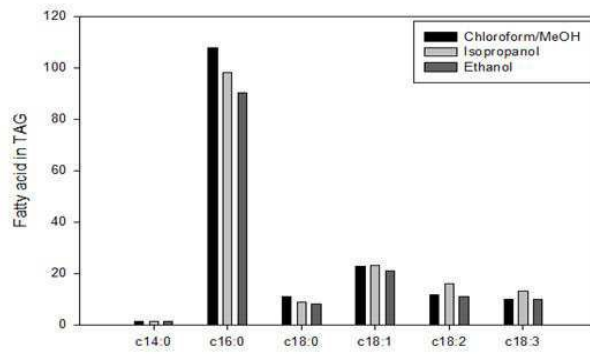
도면5b



도면5c



도면6a



도면6b



도면6c

