



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0045438
(43) 공개일자 2020년05월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12M 1/24 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12M 23/08 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0131748
(22) 출원일자 2019년10월22일
심사청구일자 없음
(30) 우선권주장
1020180125996 2018년10월22일 대한민국(KR)

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(72) 발명자
나정걸
서울특별시 마포구 모래내로1길 20 KCC상암스튜디오380 1526호
오병근
서울특별시 마포구 모래내로9길 3, 106동 1506호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
윤대웅, 공병욱

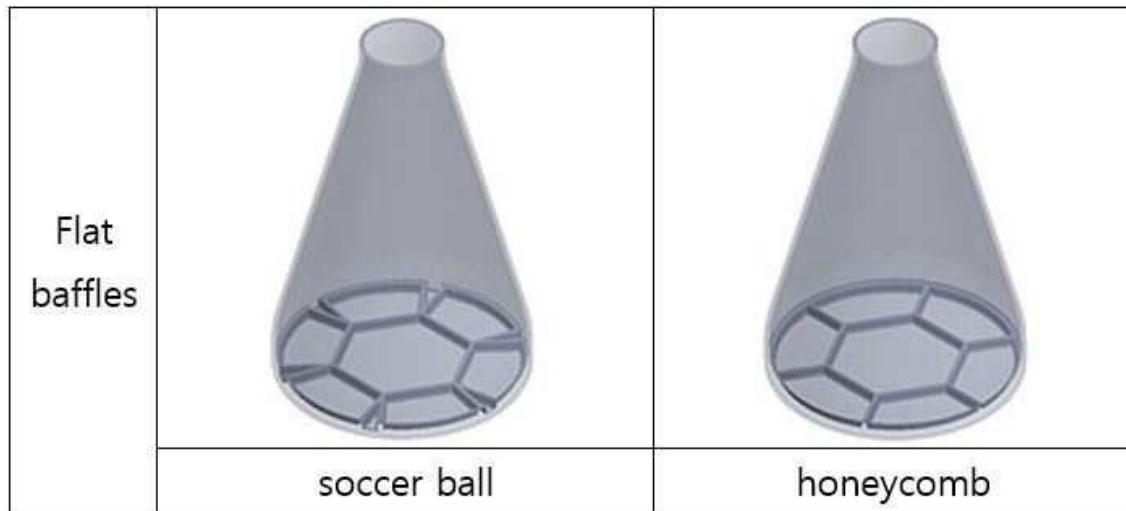
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 세포 배양용 배플 플라스크

(57) 요약

본 발명의 세포 배양용 배플 플라스크는 기존의 배플 플라스크보다 세포 배양시 안정적이고 효율적인 가스 전달이 가능하며, 우수한 세포 배양 성능을 나타낸다.

대표도 - 도1b



(72) 발명자

정상민

경기도 광명시 하안로 320 1017동 601호

임채일

전라남도 여수시 신월로 561-8, 12동 106호

이진원

서울특별시 송파구 양재대로 1218 (방이동, 올림픽선수기자촌아파트) 201동 1601호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015M3D3A1A01064929
부처명 과학기술정보통신부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 C1 가스 리파이너리 사업
연구과제명 C1 가스 전환 기술 공동시험 연구
기 여 율 20/100
주관기관 서강대학교
연구기간 2018.01.01 ~ 2018.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015M3D3A1A01064926
부처명 과학기술정보통신부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 C1 가스 리파이너리 사업
연구과제명 가스 전달 한계를 극복하는 고효율 C1 가스 전환 시스템 개발
기 여 율 80/100
주관기관 서강대학교
연구기간 2018.01.01 ~ 2018.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

세포 배양용 배플 플라스크로서,

상기 배플 플라스크는 바닥면에 돌출부를 가지며, 상기 돌출부는 상기 바닥면의 중앙에 배치된 육각형 돌출부 및 상기 육각형 돌출부의 육각면에 각각 접하여 배치된 돌출부를 포함하는 것인, 세포 배양용 배플 플라스크.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 육각형 돌출부의 육각면에 각각 접하여 배치된 돌출부는 인접한 돌출부와 접하는 면을 갖지 않는 것인, 세포 배양용 배플 플라스크.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 돌출부의 높이는 2 내지 50 mm인 것인, 세포 배양용 배플 플라스크.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 세포 배양용 배플 플라스크는 유리 또는 플라스틱으로 제조되는 것인, 세포 배양용 배플 플라스크.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 세포 배양용 배플 플라스크에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 플라스크 배양은 생물공학 연구에서 가장 널리 사용되는 방법 중의 하나이다. 특히 본격적인 반응기 수준의 연구에 앞서, 우수 균주의 분리, 배지 설계, 배양 조건 최적화 등의 많은 변수에 대한 탐색을 필요로 하는 소규모 실험에서는 대부분 플라스크가 활용되고 있다. 플라스크는 규모, 배플의 존재 및 형태에 따라 다양한 종류가 존재하나, 특별히 shear에 민감한 미생물을 제외하고는 강한 와류를 발생시켜 물질전달 특성이 우수한 배플 플라스크가 널리 이용된다.

[0004] 최근 들어 메탄이나 일산화탄소, 이산화탄소를 기질로 활용하여 연료나 화학제품 등의 유용물질을 생산하는 가스 발효 분야가 주목을 받으면서 이들을 대사하는 새로운 미생물의 탐색과 배양 조건을 찾기 위한 연구가 활발히 진행 중이다. 메탄이나 일산화탄소 기체는 수용액에 대한 용해도가 매우 낮아 가스의 효율적인 전달이 어렵기 때문에 배양의 성능은 물질전달 특성에 좌우된다. 따라서, 가스 발효용 균주의 탐색, 생리학적 특성 연구, 배양 조건 최적화를 위하여 소규모 실험에서도 안정적인 가스 전달이 가능한 고효율 플라스크의 개발이 필수적이라 할 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명자들은 안정적인 가스 전달이 가능한 고효율의 세포 배양용 플라스크를 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 플라스크 바닥면의 배플 형태와 개수를 달리하여 제작한 다양한 형태의 배플 플라스크 가운데 축구공 형태의 배플을 포함하는 플라스크에서 우수한 가스 전달 효과 및 세포 성장 효과가 나타난다는 것을 규명함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0007] 따라서, 본 발명의 목적은 세포 배양용 배플 플라스크를 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 세포 배양용 배플 플라스크로서, 바닥면에 돌출부를 가지며, 상기 돌출부는 상기 바닥면의 중앙의 육각형 돌출부 및 상기 육각형 돌출부의 육각면에 각각 접하여 배치된 돌출부를 포함하는 세포 배양용 배플 플라스크에 관한 것이다.

[0010] 본 발명자들은 안정적인 가스 전달이 가능한 고효율의 세포 배양용 플라스크를 개발하고자 노력하였고 그 결과, 플라스크 바닥면의 배플 형태와 개수를 달리하여 제작한 다양한 형태의 배플 플라스크 가운데 축구공 형태의 배플을 포함하는 플라스크에서 우수한 가스 전달 효과 및 세포 성장 효과가 나타난다는 것을 규명하였다.

[0011] 플라스크를 이용한 세포 배양은 소규모 생물공정 연구에서 가장 널리 사용되는 방법으로 균주 분리, 배지 설계, 배양 조건 최적화 등의 많은 변수에 대한 탐색을 필요로 하는 실험에 활용된다. 플라스크는 크기, 배플의 존재 및 형태에 따라 다양한 종류가 존재하나, 일반적으로는 강한 와류를 발생시켜 물질전달 특성이 우수한 배플 플라스크가 널리 이용된다.

[0012] 메탄이나 일산화탄소, 이산화탄소를 기질로 활용하여 대사하는 미생물 배양에 있어서 가스 전달은 매우 중요한 요소이다. 메탄이나 일산화탄소 기체는 수용액에 대한 용해도가 매우 낮아 가스의 효율적인 전달이 어렵기 때문에 배양의 성능은 물질전달 특성에 좌우되며 안정적으로 가스를 전달하는 것이 중요하다.

[0013] 본 발명의 세포 배양용 배플 플라스크는 바닥면의 중앙에 배치된 육각형 돌출부 및 상기 육각형 돌출부의 육각면에 각각 접하여 배치된 돌출부를 포함한다.

[0014] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 육각형 돌출부의 육각면에 각각 접하여 배치된 돌출부는 인접한 돌출부와 접하는 면을 갖지 않고, 바닥면 둘레와 접하는 면을 갖는다.

[0015] 하기 실시예에서 확인할 수 있는 바와 같이, 플라스크 바닥면의 배플 형태와 개수를 달리하여 다양한 형태의 배플 플라스크를 제작하고 이들을 이용하여 CO₂ 흡수실험 및 세포농도를 측정할 결과, 본 발명의 배플 플라스크가 기존에 사용되고 있는 기본형 삼각 플라스크 및 배플 플라스크 뿐 아니라 다양한 형태의 배플 플라스크와 비교하여 가장 우수한 가스 전달 효과 및 배양 성능을 나타냈다.

[0016] 본 발명의 세포 배양용 배플 플라스크는 당업계에서 알려진 삼각 플라스크 형태를 기본으로 바닥면에 특징적인 형태의 배플이 형성되어 있다.

[0017] 본 발명의 세포 배양용 배플 플라스크의 외관은 당업계에서 널리 사용되는 삼각 플라스크 형태로 제작될 수 있고, 크기도 세포 배양 용량에 따라 다양하게 제조할 수 있다.

[0018] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 세포 배양용 배플 플라스크의 밑면의 지름은 5 내지 300 mm, 바닥 두께는 2 내지 10 mm, 벽면 두께는 1 내지 5 mm, 높이는 5 내지 500 mm 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0019] 본 발명의 세포 배양용 배플 플라스크에서 바닥면에 형성되는 돌출부의 높이는 2 내지 50 mm일 수 있고, 플라스크 전체 크기에 대비하여 적절한 높이를 갖도록 제조할 수 있다.

[0020] 본 발명의 세포 배양용 배플 플라스크는 유리 또는 플라스틱으로 제조될 수 있고, 예를 들어, 유리로 제조될 수 있다.

발명의 효과

[0022] 본 발명의 세포 배양용 배플 플라스크는 기존의 배플 플라스크보다 세포 배양시 안정적이고 효율적인 가스 전달이 가능하며, 우수한 세포 배양 성능을 나타낸다.

도면의 간단한 설명

- [0024] 도 1a는 실험에 사용한 기성품 플라스크의 형태를 나타낸 도면이다.
- 도 1b는 본 발명에서 제조한 플랫 형태의 플라스크를 나타낸 도면이다.
- 도 1c는 본 발명에서 제조한 곡면 형태의 플라스크를 나타낸 도면이다.
- 도 1d는 본 발명에서 제조한 플랫과 곡면형이 혼합된 형태의 플라스크를 나타낸 도면이다.
- 도 1e는 도 1b의 플라스크 가운데 축구공 형태(soccer ball)의 배플을 포함하는 플라스크의 바닥면에 대한 상세도이다.
- 도 1f는 도 1b의 플라스크 가운데 벌집 형태(honeycomb)의 배플을 포함하는 플라스크의 바닥면에 대한 상세도이다.
- 도 2는 플라스크 규격을 나타낸 도면이다.
- 도 3은 배플 형태에 따른 CO₂ 용해 속도 비교 결과이다.
- 도 4는 다양한 플라스크에서의 세포 배양 결과이다.
- 도 5는 CO₂ 용해시간과 세포농도와와의 관계를 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시 예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시 예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0027] 실시예 1. 배플 플라스크 디자인

[0028] 서로 다른 모양을 갖는 10가지 형태의 배플 플라스크를 디자인하였다. 이들은 큰 범주에서 1) 기성품 3종(도 1a), 2) 플랫 배플 2종(도 1b), 3) 곡면형 배플 3종(도 1c), 4) 플랫과 곡면형이 혼합된 형태 2종(도 1d)으로 분류할 수 있다.

[0029] 플라스크의 총 부피는 600 mL이며 10가지 모두 동일하게 밑면의 지름은 100 mm, 바닥 두께는 4 mm, 벽면 두께 2 mm, 바닥 높이 15 mm, 높이 130 mm, 목 10 mm, 배플 높이 4 mm의 규격을 갖는다(도 2). 플라스크 제작을 위한 3-D modeling은 Dassault systems의 solidworks 2017 프로그램을 이용하였다.

[0030] 3D 프린터를 이용하여 설계한 플라스크를 제조하였다. 사용한 3D 프린터는 포머스팜(대한민국)의 LUGO M 프린터를 이용했으며 0.40 mm의 단일 사출구와 히팅 베드를 포함한 제품이다. 재료로는 1.75 mm의 투명한 PLA 필라멘트를 사용했으며 slicer program은 ideamaker 사의 것을 사용하였다. 실제 배양에 적용하기 위하여 제조한 플라스크는 프린팅 완료 후 70°C 오븐에서 15분 이상 건조하였고 이후 7일간 누수 테스트를 실시하였다. 누수 테스트 결과 0.08 mm의 layer height, 2 shell, first layer height 0.25 mm, printing speed 50 mm/s, 100% density의 rectilinear patterned infill, 그리고 support 없이 5 mm offset의 raft가 있는 조건을 가질 때 7일까지 누수가 발생하지 않아 배양 실험에 적용할 수 있음을 확인하였다.




[0031] 본 발명에서는 3D 프린터를 사용하여 플라스틱으로부터 플라스크를 제작하였으므로 기존의 유리 제품과 재질로 인한 차이가 발생할 수 있기 때문에 기성품과 동일한 규격과 모양을 갖는 플라스크를 대조군으로 활용하였다. 플랫 배플 플라스크의 경우 바닥에 격자 모양의 배플이 배치된 형태이고, 곡면형 배플 플라스크는 유체가 배플에 닿았을 때 부드럽게 흐를 수 있는 곡면 형태이다. 플랫과 곡면형의 특성을 모두 가질 수 있도록 혼합 형태의 배플 플라스크도 제작하였다.

[0033] 실시예 2. CO₂를 이용한 적정실험



- [0034] 본 발명에서는 플라스크의 기-액 물질전달 성능을 평가하기 위하여 CO₂를 이용한 적정실험을 실시하였다. 제조된 플라스크에 pH값이 11인 수용액 50 mL을 넣은 후, 100 μl의 페놀프탈레인 용액을 넣어 보라색이 되는 것을 확인하였다. Orbital shaker를 이용하여 150 rpm 속도에서 플라스크를 교반하면서 20 mL의 CO₂를 주입하였다. 주입 시작 순간부터 pH가 8.2가 되어 무색이 되는 순간까지의 시간을 측정하여 CO₂ 전달 속도를 판단하였다. 실험에 사용한 Orbital shaker는 정바이오텍 사의 SHK-30 제품이다.
- [0035] 배양 실험은 LB(Lysogeny Broth) 배지에서 *E. Coli* W3110을 배양하여 수행하였다. 배지의 조성은 트립톤(10 g/L), 효모 추출물(5 g/L), NaCl(10 g/L)이다. 가스 전달 성능 실험 결과에서 선정된 네 개의 플라스크와 기존 유리 플라스크를 사용하여 배양 실험을 수행하였다. 비전 과학의 VS-8480SF 진탕배양기를 이용하여 200 rpm, 37 °C에서 6시간 동안 회분식 배양을 실시하였다. 세포 농도는 UV-vis photospectrometer를 이용하여 600 nm에서의 흡광도로 측정하였다. 또한, HPLC를 이용하여 아세트산의 농도를 측정하였다.
- [0036] CO₂ 적정실험을 수행한 결과, 배플의 형태에 따라 각각 다른 가스전달 성능을 나타냈다(도 3). CO₂ 용해에 의하여 pH가 11에서 8.2까지 낮아진 시간을 측정하였을 때 배플이 없는 경우 시간이 가장 오래 소요되었다. 또한, 곡면형 배플 플라스크의 경우 기존의 바텀 배플 플라스크 보다 가스 전달 성능이 좋지 않았으며, 플랫 배플 플라스크가 가장 우수한 가스 전달 성능을 나타냈다. 플랫 배플 플라스크의 경우 종류에 따라 서로 큰 차이를 보이지는 않았으나, 축구공 형태가 벌집 형태보다 더 나은 성능을 보였다. 혼합형 배플 플라스크는 중간 정도의 성능을 나타냈다.
- [0038] **실시예 3. 배양 실험**
- [0039] 배양 실험은 LB 배지에서 *E. Coli* W3110을 배양하여 수행하였다. 배지의 조성은 트립톤(10 g/L), 효모 추출물(5 g/L), NaCl(10 g/L)이다. 가스 전달 성능 실험 결과에서 선정된 네 개의 플라스크와 기존 유리 플라스크를 사용하여 배양 실험을 수행하였다. 비전 과학의 VS-8480SF 진탕배양기를 이용하여 200 rpm, 37°C에서 6시간 동안 회분식 배양을 실시하였다. 세포 농도는 UV-vis photospectrometer를 이용하여 600 nm에서의 흡광도로 측정하였다. 또한, HPLC를 이용하여 아세트산의 농도를 측정하였다.
- [0040] 가스 전달 성능으로부터 선정한 4 바텀, 6 vortex CC, 축구공형, 기본형 플라스크(nonbaffled)에 대하여 6시간 동안 대장균 배양을 실시하였다(도 4). 비교를 위하여 배플이 없는 실제 유리 제품과 3D printer로 제작한 PLA 제품에 대하여 배양을 수행하였고, 유사한 값을 나타내어 플라스크 구조가 동일하면 유사한 배양 성능을 얻을 수 있음을 확인하였다. 또한, 가스 전달 성능이 우수한 배플 플라스크가 높은 대장균 세포농도와 낮은 초산 농도를 나타냈다.
- [0041] 본 발명에서 설계한 축구공형 배플 플라스크가 현재까지 배양에 널리 사용되는 기존형 플라스크 보다 37%, 바텀 배플 플라스크 보다 8.9% 높은 최종 OD를 기록하였다. 이는 플라스크 바닥면의 배플의 개수가 뽀족하고 많을수록 와류 형성을 촉진하여 물질전달 성능을 향상시키고 그 결과로서 높은 세포 농도를 얻을 수 있음을 시사하는 결과이다. 세포 농도가 높을수록 초산 농도는 낮았고, 이로부터 배양액 내부로 산소가 원활히 공급되어 초산이 TCA 회로를 통해 잘 산화되었음을 짐작할 수 있다.
- [0042] 도 5에 물질전달 성능과 세포 농도와의 관계를 도시하였다. 도면에서 알 수 있듯이 CO₂ 용해 시간의 역수와 세포 농도는 선형적인 관계를 나타내고 있으며, kLa가 물질전달량을 시간으로 나눈 값을 의미한다고 했을 때 물질전달계수가 높을수록 세포 생장이 활발해짐을 다시 한번 확인할 수 있다.
- [0043] 본 발명에서는 비교적 간단한 방법으로 플라스크의 바닥면에 위치한 배플의 형태와 개수를 조절함으로써 기본형 플라스크는 물론 기존의 바텀 배플 플라스크에 비해 높은 기-액 전달 속도를 얻을 수 있고, 결과적으로 세포의 활발한 성장을 유도할 수 있음을 확인하였다. 최근의 전산 유체 역학과 3D printing의 발전으로 다양한 형태의 플라스크 설계와 제작, 실제 배양에의 적용이 용이해졌으므로 바닥면은 물론 벽면에서의 배플 설계를 통하여 보다 우수한 배플 플라스크의 제작이 가능할 것으로 기대된다.

도면




도면1a

기 성 배			
	unbaffled	3 bottom	4 bottom



도면1b

Flat baffles		
	soccer ball	honeycomb

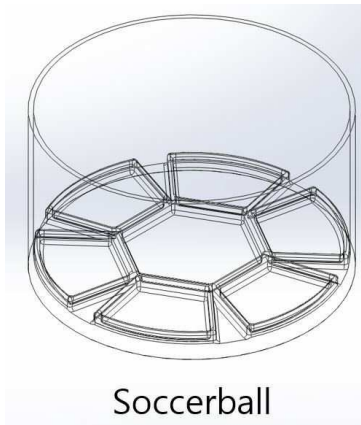
도면1c

Curved baffles			
	3 wave	6 wave	6 wave with center ball

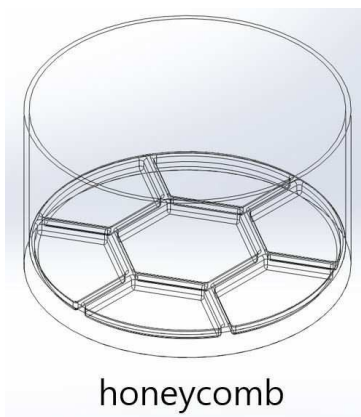
도면1d

Mixed baffles		
	6 vortex clockwise	6 vortex counterclockwise

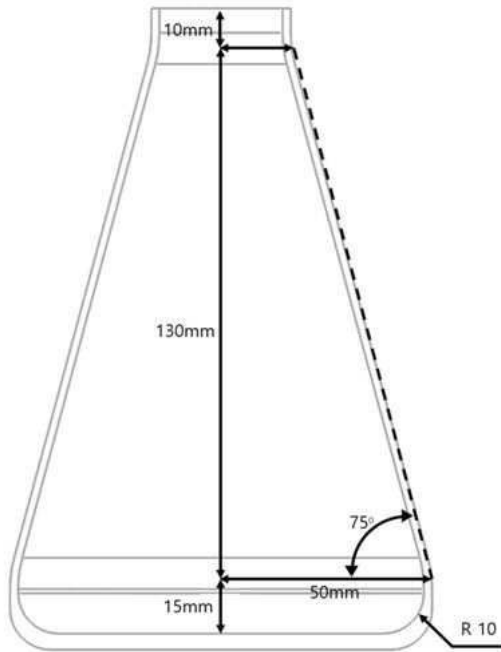
도면1e



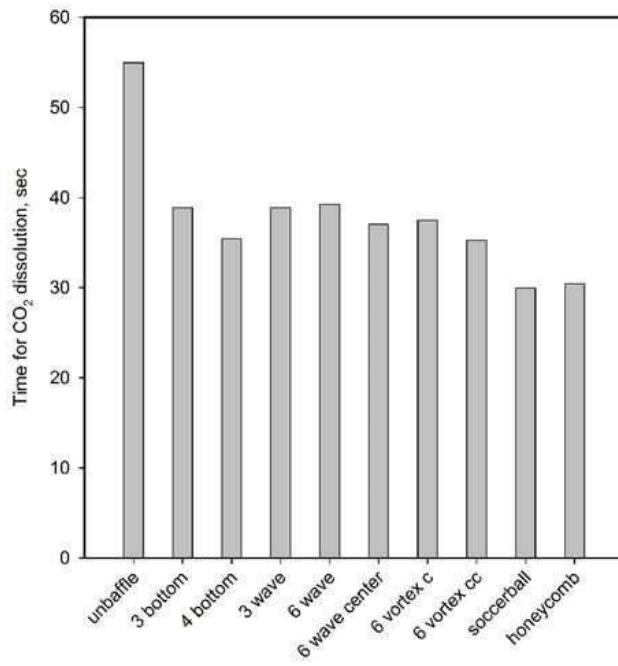
도면1f



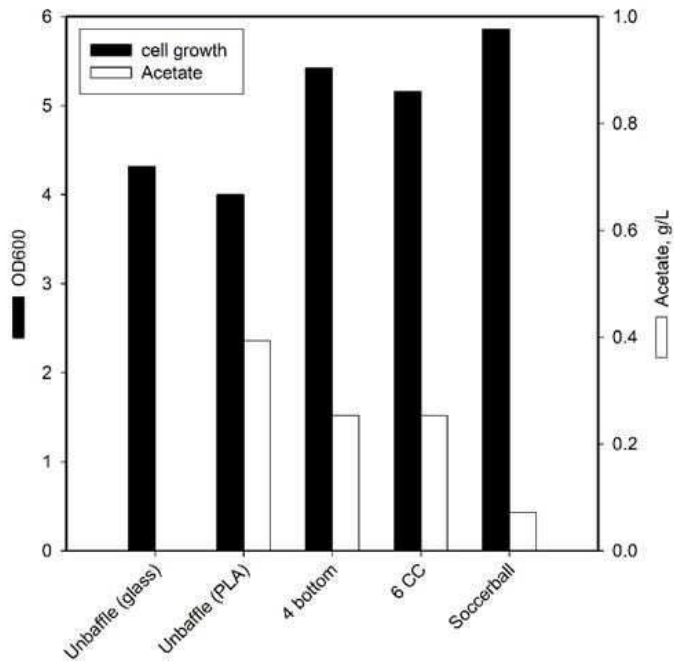
도면2



도면3



도면4



도면5

