



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0087421
(43) 공개일자 2011년08월03일

(51) Int. Cl.

C12Q 1/02 (2006.01) *G06F 19/00* (2011.01)

C12M 3/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0006834

(22) 출원일자 2010년01월26일

심사청구일자 2010년01월26일

(71) 출원인

인하대학교 산학협력단

인천 남구 용현동 253 인하대학교

(72) 발명자

신화성

인천광역시 남구 학익동 동아풍림아파트 108-103

김성훈

서울특별시 강서구 화곡5동 1057-24 3층

이병만

충청남도 공주시 장기면 봉안리 107-3번지

(74) 대리인

김원식

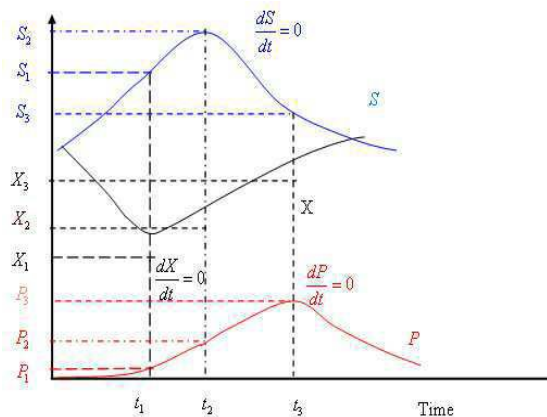
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 유가 배양의 모델링을 위한 정량적 분석 방법

(57) 요약

본 발명은 유가 배양(fed-batch culture) 방식으로 배양기에서 세포를 배양하여 생성물(product)을 형성함에 있어서, 배양 과정 중 배양기의 내부가 일시적 평형 상태에 도달하는 시점에서 배양되는 세포의 성장 속도(net specific growth rate), 기질 소비 속도(net specific substrate consumption rate), 그리고 생성물 형성율(net specific product formation)을 측정할 수 있게 하는 유가 배양의 모델링을 위한 정량적 분석 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

유가 배양(fed-batch culture) 방식으로 배양기에서 세포를 배양하여 생성물(product)을 형성함에 있어서,

세포가 포함된 일정량의 배양액을 배양기에 주입하는 제1단계;

상기 세포를 성장시키기 위한 기질(substrate)이 포함된 배양액을 일정한 유량으로 배양기 내부에 주입하는 제2 단계;

배양기 안의 세포 농도가 일시적으로 평형 상태를 이루는 시점을 찾아내는 제3단계;

배양기 안의 세포 농도가 일시적으로 평형 상태를 이루는 시점에서, 배양기 안의 배양액 부피와 배양기 안으로 주입되는 배양액의 유속을 각각 측정하는 제4단계;

상기 배양되는 세포의 성장 속도를 하기의 수학식 2로 연산하는 제5단계;

를 포함하는 것을 특징으로 하는 유가 배양의 모델링을 위한 정량적 분석 방법.

[수학식 2]

$$\mu = \frac{F}{V}$$

(V는 배양기 안의 배양액 부피, F는 배양기 안으로 주입되는 배양액의 일정 유속, 그리고 μ 는 세포의 성장 속도를 나타낸다.)

청구항 2

제1항에 있어서,

배양기 안의 기질 농도가 일시적으로 평형 상태를 이루는 시점을 찾아내는 제6단계;

배양기 안의 기질 농도가 일시적으로 평형 상태를 이루는 시점에서, 배양기 안의 세포 농도, 배양기 안의 배양액 부피, 배양기 안의 기질 농도, 배양기로 투입되는 기질의 농도, 배양기 안으로 주입되는 배양액의 유속을 측정하는 제7단계;

상기 배양되는 세포의 기질 소비 속도를 하기의 수학식 3으로 연산하는 제8단계;

를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 유가 배양의 모델링을 위한 정량적 분석 방법.

[수학식 3]

$$\sigma = \frac{F(S_F - S)}{XV}$$

(V는 배양기 안의 배양액 부피, F는 배양기 안으로 주입되는 배양액의 일정 유속, X는 배양기 안의 세포 농도, S는 배양기 안의 기질 농도, S_F 는 배양기로 투입되는 기질의 농도, 그리고 σ 는 세포의 기질 소비 속도를 나타낸다.)

청구항 3

제1항에 있어서,

배양기 안의 생성물 농도가 일시적으로 평형 상태를 이루는 시점을 찾아내는 제9단계;

배양기 안의 생성물 농도가 일시적으로 평형 상태를 이루는 시점에서, 배양기 안의 세포 농도, 배양기 안의 배

양액 부피, 배양기 안의 생성물 농도, 배양기 안으로 주입되는 배양액의 유속을 측정하는 제10단계;

생성물의 형성율을 하기의 수학적 식 4로 연산하는 제11단계;

를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 유가 배양의 모델링을 위한 정량적 분석 방법.

[수학적 식 4]

$$\pi = \frac{PF}{XV}$$

(V는 배양기 안의 배양액 부피, F는 배양기 안으로 주입되는 배양액의 일정 유속, X는 배양기 안의 세포 농도, P는 배양기 안의 생성물 농도, 그리고 π 는 생성물의 형성율을 나타낸다.)

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

배양기 안으로 주입되는 배양액의 유속을 일정하게 유지하여, 배양기 안의 배양액 부피를 하기의 수학적 식 5로 연산하는 것을 특징으로 하는 유가 배양의 모델링을 위한 정량적 분석 방법.

[수학적 식 5]

$$F = F_c$$

$$V = V_0 + F_c t$$

(V₀는 초기 배양기 안의 배양액 부피, F_c는 일정하게 유지되는 배양액의 유속, t는 시간, 그리고 V는 배양기 안의 배양액 부피를 나타낸다.)

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 유가 배양의 모델링을 위한 정량적 분석 방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 유가 배양(fed-batch culture) 방식으로 배양기에서 세포를 배양하여 생성물(product)을 형성함에 있어서, 배양 과정 중 배양기의 내부가 일시적 평형 상태에 도달하는 시점에서 배양되는 세포의 성장 속도(net specific growth rate), 기질 소비 속도(net specific substrate consumption rate), 그리고 생성물 형성율(net specific product formation)을 측정할 수 있게 하는 유가 배양의 모델링을 위한 정량적 분석 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 유용산물 생산을 위한 미생물 배양은 다양한 형태의 생물 반응기 그리고 이에 대한 공정제어 및 최적화 방법들을 도출 시켰다.

[0003] 미생물 배양은 식물 또는 동물 세포 배양과는 다르게 생화학 반응기 안에서 세포의 수가 늘어나는 일종의 화학 반응이 일어나는 것에 기초한다. 일반적인 배양 방법으로는 회분 배양(batch culture), 연속 배양(continuous culture), 그리고 유가 배양(fed-batch culture)의 3가지가 대표적이다.

[0004] 회분 배양(batch culture)은 배양 기간 중 필요한 모든 성분의 배지를 처음에만 공급하고 배양이 끝날 때까지 새로 추가되지 않는 배양 방법이다. 이러한 회분 배양에 의하면, 배양기의 각 성분 농도는 임의로 조절될 수 없고 오로지 배양기 안에서 배양되는 세포의 활동만으로 변화할 수 있으며, 세포의 배양에 따른 결과물(이하, '생성물')도 배양이 끝난 후에만 획득할 수 있다. 그러므로 이러한 회분 배양에서는 배양의 최적화 변수가 초기 배지의 성분이며, 배양 중에는 온도와 pH, 산소 그리고 배양 중 생기는 거품의 양을 조절하여 배양의 생산성을 높인다.

[0005] 다음으로, 연속 배양(continuous culture)은 필수 영양성분들을 일정하게 계속 배양기에 공급해주되, 주입해 주

는 양만큼의 배지를 배양기에서 배출시키는 배양 방법이다. 따라서 이러한 연속 배양에 의하면, 배양기 내에는 항상 일정 양의 성분과 세포 수가 유지되므로 평형 상태(steady state)를 형성하게 된다. 이러한 연속 배양은 계속해서 생성물(product)을 회수할 수 있지만, 멸균 상태를 지속하면서 배양하는데 어려움이 있기 때문에 생물 공학적으로 보다는 화학공학적으로 그 쓰임이 크다고 할 것이다.

[0006] 마지막으로, 유가 배양(fed-batch culture)은 세포가 자라고 생성물(product)을 생산하는데 필요한 영양성분을 간헐적 또는 연속적으로 배양기에 주입하면서, 배양기 외부로는 배출시키지 않는 배양 방법이다. 이러한 유가 배양에 의하면, 최종 생성물은 회분 배양과 마찬가지로 배양이 끝나는 시점에서 획득될 수 있지만, 배양기에 주입된 만큼 생성물을 획득하고 다시 운전을 시작하는 방식으로 생산성을 높일 수 있다. 그리고 유가 배양 방식은 영양성분을 주입해주는 과정에서 원하는 만큼 넣어줄 수 있으므로 배양 중 배양기의 성분 조절도 가능하다.

[0007] 따라서 지난 30년간 유가 배양 방식은 생물학적, 화학적 산업에서 널리 쓰이고 있으며, 다른 두 방법에 비해 효율을 높일 수 있다는 장점으로 그 쓰임이 늘어나고 있다.

[0008] 한편, 종래에는 회분 배양 및 연속 배양에 관해서는, 배양과정에 대한 모델링을 위해 정량적인 분석이 가능하였다. 즉, 회분 배양 또는 연속 배양 방식으로 배양되는 세포의 성장 속도(net specific growth rate), 기질 소비 속도(net specific substrate consumption rate), 그리고 생성물 형성율(net specific product formation)에 관한 정량적인 분석이 가능하다.

[0009] 그러나 이러한 회분 배양 및 연속 배양과 달리 유가 배양 방식에 있어서는 모델링을 위한 정량적인 분석을 할 수 있는 방법이 개발되지 않고 있다. 그로 인해, 유가 배양 방식으로 세포를 배양하면서도 회분 배양이나 연속 배양에 따른 모델링 정량 분석 방법을 이용하고 있는 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 상기와 같은 종래의 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로서, 유가 배양 방식으로 배양되는 세포의 성장 속도, 기질 소비 속도, 그리고 생성물 형성율을 보다 용이하고 정확하게 측정할 수 있게 하는 유가 배양의 모델링을 위한 정량적 분석 방법을 제공하는 것을 본 발명의 주요한 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기와 같은 목적을 해결하기 위한 본 발명에 따른 유가 배양의 모델링을 위한 정량적 분석 방법은, 유가 배양(fed-batch culture) 방식으로 배양기에서 세포를 배양하여 생성물(product)을 형성함에 있어서, 세포가 포함된 일정량의 배양액을 배양기에 주입하는 제1단계; 상기 세포를 성장시키기 위한 기질(substrate)이 포함된 배양액을 일정한 유량으로 배양기 내부에 주입하는 제2단계; 배양기 안의 세포 농도가 일시적으로 평형 상태를 이루는 시점을 찾아내는 제3단계; 배양기 안의 세포 농도가 일시적으로 평형 상태를 이루는 시점에서, 배양기 안의 배양액 부피와 배양기 안으로 주입되는 배양액의 유속을 각각 측정하는 제4단계; 상기 배양되는 세포의 성장 속도를 하기의 수학식으로 연산하는 제5단계;를 포함하는 것을 특징으로 한다.

$$\mu = \frac{F}{V}$$

[0012]

[0013] (V는 배양기 안의 배양액 부피, F는 배양기 안으로 주입되는 배양액의 일정 유속, 그리고 μ 는 세포의 성장 속도를 나타낸다.)

[0014] 또한 본 발명은, 배양기 안의 기질 농도가 일시적으로 평형 상태를 이루는 시점을 찾아내는 제6단계; 배양기 안의 기질 농도가 일시적으로 평형 상태를 이루는 시점에서, 배양기 안의 세포 농도, 배양기 안의 배양액 부피, 배양기 안의 기질 농도, 배양기로 투입되는 기질의 농도, 배양기 안으로 주입되는 배양액의 유속을 측정하는 제7단계; 상기 배양되는 세포의 기질 소비 속도를 하기의 수학식으로 연산하는 제8단계;를 더 포함하는 것을 특징으로 한다.

$$\sigma = \frac{F(S_F - S)}{XV}$$

[0015]

[0016]

(V는 배양기 안의 배양액 부피, F는 배양기 안으로 주입되는 배양액의 일정 유속, X는 배양기 안의 세포 농도, S는 배양기 안의 기질 농도, S_F는 배양기로 투입되는 기질의 농도, 그리고 σ는 세포의 기질 소비 속도를 나타낸다.)

[0017]

또한 본 발명은, 배양기 안의 생성물 농도가 일시적으로 평형 상태를 이루는 시점을 찾아내는 제9단계; 배양기 안의 생성물 농도가 일시적으로 평형 상태를 이루는 시점에서, 배양기 안의 세포 농도, 배양기 안의 배양액 부피, 배양기 안의 생성물 농도, 배양기 안으로 주입되는 배양액의 유속을 측정하는 제10단계; 생성물의 형성율을 하기의 수학식으로 연산하는 제11단계;를 더 포함하는 것을 특징으로 한다.

$$\pi = \frac{PF}{XV}$$

[0018]

[0019]

(V는 배양기 안의 배양액 부피, F는 배양기 안으로 주입되는 배양액의 일정 유속, X는 배양기 안의 세포 농도, P는 배양기 안의 생성물 농도, 그리고 π는 생성물의 형성율을 나타낸다.)

[0020]

아울러 본 발명은, 배양기 안으로 주입되는 배양액의 유속을 일정하게 유지하여, 배양기 안의 배양액 부피를 하기의 수학식으로 연산하는 것을 특징으로 한다.

$$F = F_c$$

[0021]

$$V = V_0 + F_c t$$

[0022]

[0023]

(V₀는 초기 배양기 안의 배양액 부피, F_c는 일정하게 유지되는 배양액의 유속, t는 시간, 그리고 V는 배양기 안의 배양액 부피를 나타낸다.)

발명의 효과

[0024]

상기와 같은 구성을 가지는 본 발명에 따른 유가 배양의 모델링을 위한 정량적 분석 방법에 의하면, 유가 배양 방식으로 배양되는 세포의 성장 속도, 기질 소비 속도, 그리고 생성물 형성율을 보다 용이하고 정확하게 측정할 수 있게 된다.

도면의 간단한 설명

[0025]

도 1은 유가 배양 과정 중 일시적인 평형 상태를 나타내는 그래프.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026]

이하에서는 본 발명에 따른 유가 배양의 모델링을 위한 정량적 분석 방법에 대한 바람직한 실시예를 상세하게 설명한다.

[0027]

본 발명은 유가 배양(fed-batch culture) 방식으로 세포를 배양하여 생성물(product)을 형성하는 과정에서, 배양되는 세포 및 생성물의 세포의 성장 속도(net specific growth rate), 기질 소비 속도(net specific substrate consumption rate), 그리고 생성물 형성율(net specific product formation)에 관한 정량적인 분석을 가능하게 한다.

[0028]

이를 위해, 유가 배양 방식으로 배양하고자 하는 세포가 포함된 일정량의 배양액을 배양기에 미리 주입한다.

[0029]

그리고 상기 세포를 성장시키기 위한 기질(substrate)이 포함된 배양액을 배양기 내부로 일정한 속도로 주입한다.

[0030]

한편, 이러한 유가 배양에 대해 하기의 질량 보존식을 적용할 수 있다.

수학식 1

$$\frac{d(XV)}{dt} = \frac{dX}{dt} V + X \frac{dV}{dt} = \frac{dX}{dt} V + XF = \mu XV$$

$$X(0)V(0) = X_0 V_0$$

$$\frac{d(SV)}{dt} = \frac{dS}{dt} V + S \frac{dV}{dt} = \frac{dS}{dt} V + S_F F - \sigma XV$$

$$S(0)V(0) = S_0 V_0$$

$$\frac{d(PV)}{dt} = \frac{dP}{dt} V + P \frac{dV}{dt} = \frac{dP}{dt} V + PF = \pi XV$$

$$P(0)V(0) = P_0 V_0$$

$$\frac{dV}{dt} = F$$

$$V(0) = V_0$$

여기서, X는 배양기 안의 세포 농도, V는 배양기 안의 배양액 부피, S는 배양기 안의 기질 농도, S_F는 배양기로 투입되는 기질의 농도, P는 배양기 안의 생성물 농도, F는 배양기 안으로 주입되는 배양액의 유속을 나타낸다.

그리고 μ 는 세포의 성장 속도(net specific growth rate), σ 는 세포의 기질 소비 속도(net specific substrate consumption rate), π 는 생성물의 형성율(net specific product formation)을 나타낸다.

한편, 유가 배양 방식으로 배양되는 과정 중 특정한 시점에서 배양기의 내부가 일시적으로 평형 상태에 도달하는 순간이 나타나게 되고, 이러한 평형 상태의 시점에서 배양기 안의 세포 농도(X), 배양기 안의 배양액 부피(V), 배양기 안의 기질 농도(S), 배양기로 투입되는 기질의 농도(S_F), 배양기 안의 생성물 농도(P), 배양기 안으로 주입되는 배양액의 유속(F)을 측정한다.

그리고 이러한 평형 상태에서는 상기의 질량 보존식에서 시간에 대한 도함수를 지울 수 있으며, 따라서 각각의 식은 하기의 수학식 2 내지 4로 표현될 수 있다.

수학식 2

$$\mu = \frac{F}{V}$$

수학식 3

$$\sigma = \frac{F(S_F - S)}{XV}$$

[0044]

수학식 4

$$\pi = \frac{PF}{XV}$$

[0045]

[0046] 여기서, 상기 수학식 1은 유가 배양 방식으로 배양되는 세포의 성장 속도(net specific growth rate)를 연산할 수 있게 하는 수식이고, 상기 수학식 2는 유가 배양 방식으로 배양되는 세포의 기질 소비 속도(net specific substrate consumption rate)를 연산할 수 있게 하는 수식이며, 상기 수학식 3은 유가 배양 방식으로 배양된 생성물의 형성율(net specific product formation)을 연산할 수 있게 하는 수식이라 할 것이다.

[0047] 한편, 특정한 시점에서 특정한 성분이 평형 상태를 이룰 수는 있지만, 모든 성분이 동시에 평형 상태를 이루기는 어려울 것이다. 따라서 본 발명에서는, 특정 시점에서 특정 성분이 평형 상태를 이룰 때, 해당 성분의 시간에 따른 도함수를 무시하여 정량적 분석을 진행하게 된다.

[0048] 예를 들어, 배양기 안의 세포 농도(X)가 일시적으로 평형 상태를 이루는 시점에서는 dX/dt 를 무시할 수 있으므로, 이때 배양기 안의 배양액 부피(V)와 배양기 안으로 주입되는 배양액의 유속(F)을 측정한 후, 수학식 2를 이용하여 세포의 성장 속도를 연산할 수 있게 된다.

[0049] 또한 배양기 안의 기질 농도(S)가 일시적으로 평형 상태를 이루는 시점에서는 dS/dt 를 무시할 수 있으므로, 이때 배양기 안의 세포 농도(X), 배양기 안의 배양액 부피(V), 배양기 안의 기질 농도(S), 배양기로 투입되는 기질의 농도(S_F), 배양기 안으로 주입되는 배양액의 유속(F)을 측정한 후, 수학식 3을 이용하여 배양되는 세포의 기질 소비 속도를 연산할 수 있게 된다.

[0050] 또한 배양기 안의 생성물 농도(P)가 일시적으로 평형 상태를 이루는 시점에서는 dP/dt 를 무시할 수 있으므로, 이때 배양기 안의 세포 농도(X), 배양기 안의 배양액 부피(V), 배양기 안의 생성물 농도(P), 배양기 안으로 주입되는 배양액의 유속(F)을 측정한 후, 수학식 4를 이용하여 생성물의 형성율을 연산할 수 있게 된다.

[0051] 상기 수학식 2 내지 4는 연속 배양의 질량 보존식과 유사하다. 그러나 연속 배양은 배양 과정 중 모든 시간에 걸쳐 하나의 평형 상태를 유지하게 되므로 시간이 변수가 될 수 없지만, 유가 배양에서는 $V(t)$ 가 시간에 따라 변한다.

[0052] 따라서 본 발명에서는 배양기 안으로 주입되는 배양액의 유속(F)을 일정하게 유지함으로써, 배양액의 유속(F)이 시간에 따라 변하지 않도록 설정한다.

[0053] 이처럼 배양액의 유속(F)이 상수가 되면, 배양기 안의 배양액 부피(V)는 시간에 따라 변하게 되고, 하기의 수식으로 표현될 수 있게 된다.

수학식 5

$$F = F_c$$

[0054]

$$V = V_0 + F_c t$$

[0055]

[0056] 여기서 V_0 는 초기 배양기 안의 배양액 부피를 나타내고, F_c 는 일정하게 유지되는 배양액의 유속을 나타낸다.

[0057] 그리고 상기 수학적식 2 내지 4에 수학적식 5를 적용하면 다음과 같이 표현될 수 있다.

수학적식 6

$$\mu = \frac{F}{V} = \frac{F_c}{V_0 + F_c t} = \frac{1}{V_0/F_c + t}$$

[0058]

$$\sigma = \frac{F_c (S_F - S)}{X (V_0 + F_c t)} = \frac{(S_F - S)}{X [(V_0/F_c) + t]}$$

[0059]

$$\pi = \frac{F_c P}{X [V_0 + F_c t]} = \frac{P}{X [(V_0/F_c) + t]}$$

[0060]

[0061] 이처럼 상기 수학적식 6은 시간에 관련한 도함수가 0이고, X, S, P의 농도와 초기 부피, 그리고 항상 일정하게 유지되는 배양액 유속으로 나타낼 수 있다. 따라서 도 1에 도시된 바와 같이, X, S, P의 농도가 극한값에 도달하여 일시적인 평형 상태를 이루게되면 시간에 관한 도함수 부분을 지울 수 있으므로, 상기 수학적식 6을 통해 유가 배양의 정량적 분석이 가능하게 된다.

[0062] 이상의 설명에서 본 발명은 미생물의 생성물 생산과 관련하여 도시 및 설명하였지만, 특허청구범위에 의해 나타난 발명의 사상 및 영역으로부터 벗어나지 않는 한도 내에서 다른 세포들의 배양 및 생성물 생산 모델링에도 적용할 수 있다는 것을 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자라면 누구나 쉽게 알 수 있을 것이다.

도면

도면1

