

식물조직배양용 바이오리액터의 농도제어 시스템 개발

정석현¹, 노대현¹, 강창호¹, 강석원^{1*}, 한봉희², 이기명³, 나영선⁴

¹농업공학연구소, ²원예연구소, ³경북대학교, ⁴안산공과대학

Development of an Automated Control System for Bioreactor using the Plant Tissue Culture

Seok-Hyun Chung¹, Daehyun No¹, Changho Kang¹, Sukwon Kang^{1*},
Bong-Hee Han², Gee-Myung Lee³, Young-Sun Na⁴

¹Bio-production Fundamental Engineering Division, National Institute of Agricultural Engineering, RDA, Suwon 441-100, Korea

²Horticulture Biotechnology Division, National Horticulture Research Institute, RDA, Suwon 440-310, Korea

³Agricultural Machinery Engineering, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

⁴Ansan College of Technology, 671 Choji-dong, Ansan-city, Kyungki-do 425-792, Korea

ABSTRACT The bioreactor system for the large-scale plant tissue culture was developed to control the pH concentration and DO (dissolved oxygen), and air flowrate. The system controlling the proper air flow rate for each bulblet growth stage and monitoring the contamination of bioreactor using the pH change was controled by computer program. For the uniform bulblet distribution in bioreactor, the proper air flow rate was 300 cc/min at the beginning of bulblet culture, 400 cc/min after 20 days, 500 cc/min after 40 days, 600 cc/min after 60 days, and 700 cc/min after 80 days. It was possible to maintain the pH concentration within 5.5 ± 0.5 during the culture by control system of bioreactor.

Key words: Air flow rate control, automation, bioreactor, pH control, tissue culture

서 론

식물조직배양에 의한 식물묘의 생산에 관한 연구는 감자, 나리, 난 등에서 활발하게 수행되고 있으며, 일부 작물에서는 실용화되어 바이러스 프리묘의 대량생산이 이루어지고 있다. 이러한 식물조직배양묘의 생산에는 통상 한천 배지를 이용한 고체배지를 많이 이용하고 있으나 고체배지에서의 배양은 배양이나 수확 등 일련의 작업이 매우 번거로우며, 숙달된 인력을 요구하며, 생산비가 높은 단점이 있다. 따라서 배양묘를 저가로 대량생산하기 위해서는 공업적인 생산기술의 개발이 요구된다. 바이오리액터를 이용한 액체배양에 의한 증식법은 고체배지를 이용한 증식법에 비

해 대규모화 및 자동화가 가능하여 생산비의 절감과 생산능력의 향상이 가능하리라 생각된다 (Nagaoka 1991).

바이오리액터는 생물체를 배양하거나 미생물을 이용한 발효 (fermentation) 또는 생체변화 등을 할 수 있는 장치를 말하며, 미생물 배양시에는 발효기 (fermenter), 식물체 또는 동물세포를 배양하는 경우는 바이오리액터 (생물반응기)라 한다. 특히, 과거부터 세균이나 효모 같은 미생물을 이용하여 된장·간장·술·식초 등을 만들 때의 발효조 (醱酵槽) 등 식품산업을 중심으로 바이오리액터에 관한 연구들이 수행되어 왔다. 식물조직배양에 있어서는 1980년대 이후 일본 등에서 바이오리액터를 이용한 식물의 부정배나 캘러스 등의 생산연구가 수행되었으며 (Aitken-Christie et al. 1995), 국내에서는 임업연구원에서의 산삼배양, 충북대학교에서의 거베라 및 인삼 대량증식에 바이오리액터를 이용한 연구가 수행되었다 (Kang et al. 2002).

*Corresponding author Tel 031-290-1889 Fax 031-290-1930

E-mail skang@rda.go.kr

식물조직배양에 있어서 식물조직의 물리적, 생리적 특성상 발효나 세포증식 등에 이용되는 바이오리액터를 그대로 사용하는 데는 상당한 문제점들이 있다. 특히 식물조직은 물리적 충격에 약하여 기계적 교반을 하기가 곤란하므로 바이오리액터를 이용한 식물조직배양에 있어서 물리적 스트레스에 약한 식물조직의 특성상 회전날개 등을 이용한 교반을 할 수 없으며, 또한 진탕을 위한 별도의 교반장치를 사용할 수 없기 때문에 바이오리액터 내부로 공기를 주입하여 주입된 공기의 유동에 의하여 배양액을 교반하여 배양을 하게 된다 (Takahashi 1993). 본 연구에서는 나리 구근의 비대를 위한 배양으로 암환경하에서 4개월간 연속 배양을 하게 되므로 나리 구근은 지속적으로 호흡을 통하여 성장하게 된다. 관행의 배양에서는 바이오리액터 내부로 주입되는 공기의 양을 전체 배양 기간에 걸쳐 항상 일정한 공기량을 주입하여 배양초기에는 너무 과도한 교반으로 배양 구근이 노출되며, 배양후기로 갈수록 성장한 구근들이 바이오리액터 하부로 침전되어 주입되는 공기의 흐름을 막아 충분한 교반이 이루어지지 않는 문제점이 있었다. 따라서 바이오리액터내의 주입공기량의 제어는 자동제어의 분류상 목표 값을 고정시키지 않고 배양조직의 성장에 따라서 변화하는 추종제어 개념을 도입할 필요가 있다. 즉, 성장을 지속시킬 수 있는 하한 용존산소량과 공기부양에 따른 물리적 스트레스를 최소화할 수 있는 공기 주입량을 고려하여야 한다.

또한, 액체배지를 이용하는 식물조직배양에서의 pH 농도의 변화는 고형배지를 이용하였을 때와는 달리 그 변화가 매우 급격한 것으로 알려져 있다. 배양액 속에서의 pH 농도의 급격한 변화는 질소원 등의 무기이온이 이온화되는 것을 방해하여 성장에 악영향을 미치게 된다. 일반적으로 식물 조직배양에서 요구되는 적정 pH 농도는 작물이나 배양단계에 따라 다르지만, Nagaoka (1991)의 연구에 의하면 대부분의 식물체의 생체 pH 농도는 5.5에서 6.5 범위의 약산성이다.

본 보에서는 바이오리액터를 이용한 나리구근의 대량생산 방법에 대한 연구를 위하여 바이오리액터 내의 배양액 산도와 주입공기량을 온라인으로 제어할 수 있는 시스템을 제작하였으며, 제작된 시스템의 성능시험 내용을 보고하고, 제 2보에서는 제작한 시스템을 이용하여 나리구근을 배양하고, 배양된 구근을 관행의 배양법과 비교하여 배양액 농도제어 효과를 검증하는 내용을 보고하고자 한다.

재료 및 방법

시스템의 구성

본 연구에서 사용한 바이오리액터는 나리 구근의 조직배

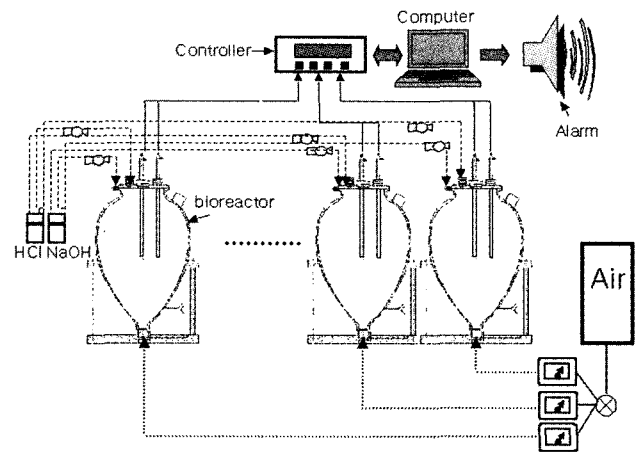


Figure 1. Schematic diagram of an automated control system of bioreactor.

양에 이용되는 풍선 타입의 공기부양형식의 바이오리액터로 용량은 20 L며, 고압멸균을 위하여 파이렉스 재질로 제작된 것을 이용하였다. 또한 일반적으로 발효나 세포증식을 위하여 사용되는 바이오리액터의 제어시스템은 하나의 제어시스템으로 1기의 바이오리액터만을 제어하도록 구성되어 있어 시스템의 효율적인 운용에서 문제가 되어왔다. 따라서 본 연구에서는 Figure 1에서 나타낸 것과 같이 하나의 제어시스템으로 여러 대의 바이오리액터를 동시에 제어할 수 있도록 하였으며, pH농도 계측 및 제어부, DO농도 계측 및 주입공기량 제어부, pH 농도와 DO 농도 데이터 저장 및 나리구근의 성장에 따른 추종제어를 위한 제어용 컴퓨터 및 오염경보장치로 구성하였다.

pH 농도제어

본 연구의 공시작물인 oriental hybrid casa blanca 자구의 배양에 있어서 배양액의 pH 농도 제어 목표값을 5.0~6.0로 하여 시험을 수행하였다. pH 농도의 계측은 각 바이오리액터 내에 전극을 삽입하고 전극으로부터의 신호를 low pass filter와 pre-amp를 통과한 후 아날로그 멀티플렉서에서 분할한 후 디지털신호로 변환하여 제어기에 저장되도록 하였다. 시스템의 구성을 간단히 하기위하여 하나의 신호변환기(transmitter)를 이용하여 pH 전극 8개와 dissolved oxygen (DO, 용존산소량) 전극 8개의 신호를 처리할 수 있도록 제작하였다. Figure 2는 시스템의 제어 블록 다이어그램을 나타낸다. 또한 pH 전극은 2~12의 범위에서 측정이 가능하며, 고압멸균(121℃, 40분, 2 bar)의 공정에서도 내구성을 가지며, 연속적으로 4개월 이상 사용할 수 있는 것을 선택하였다.

pH의 제어는 Figure 3과 같이 사전에 프로그램화된 설정값과 측정된 값을 비교하여 산(0.1 N HCl)과 염기(0.1 N NaOH) 용액을 바이오리액터내로 주입하여 제어하도록

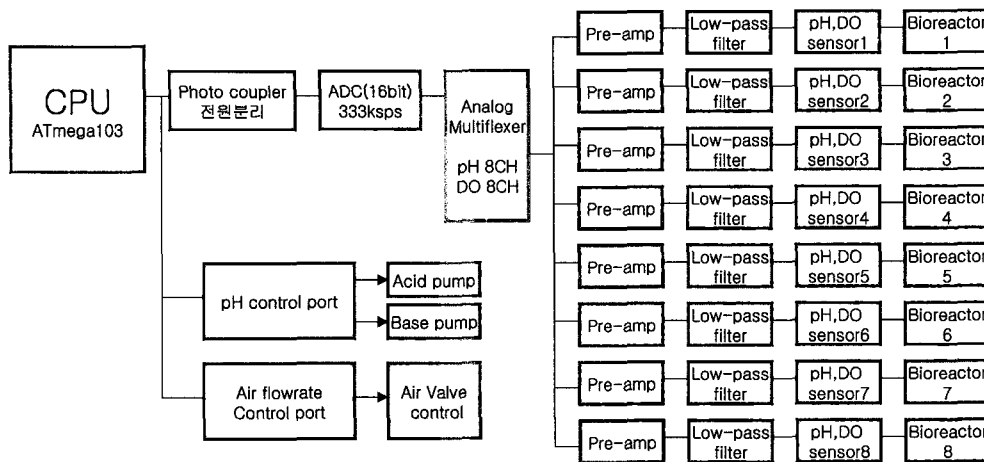


Figure 2. System block diagram. ADC, analog to digital converter; DO, dissolved oxygen.

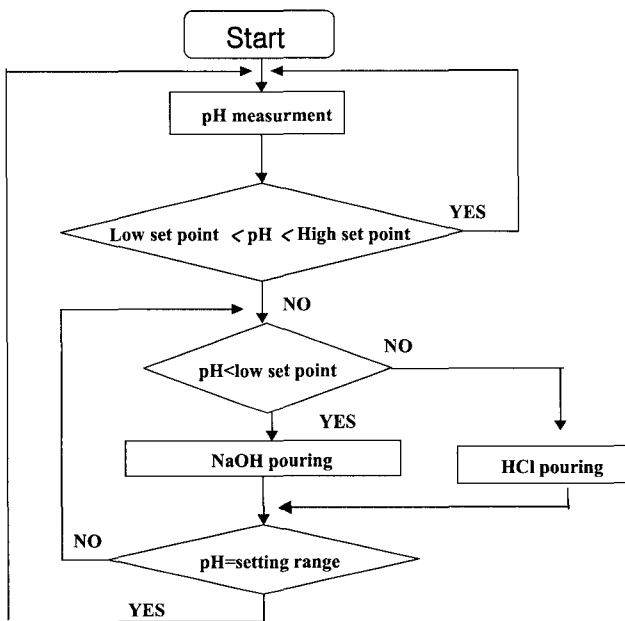


Figure 3. Flowchart of the pH control.

하였다. 산·염기 용액주입은 정량펌프를 이용하여 적정량의 산·염기 용액이 주입되도록 하였다. 설정값은 하한값과 상한값을 설정하여 그 범위내에서 항상 유지되도록 하였으며, Figure 3과 같이 전극으로부터 측정된 바이오리액터내의 pH값이 설정 범위 내에 있지 않으며 동시에 계측값이 설정 하한값 이하일 경우에는 염기 공급 정량펌프를

구동하여 염기를 공급하게 되고 설정 상한값 이상일 경우에는 산 공급 정량펌프를 구동시켜 설정 범위 내에서 항상 일정하게 pH 값을 유지하도록 하였다.

DO의 측정 및 주입공기량의 제어

나리구근의 배양 단계에 따른 주입공기량을 결정하기 위한 시뮬레이션을 수행하였다. 시뮬레이션을 위하여 나리구근의 배양기간의 경과에 따른 구근의 크기와 바이오리액터 내부에서의 구근의 위치를 변수로 하여 주입공기량을 100 mL/min에서 1,000 mL/min까지 변화시키며 바이오리액터 내부의 배양액 유속을 시뮬레이션 하였다. Table 1은 시뮬레이션 조건을 나타내고 있다.

시뮬레이션에 이용된 배양액은 비압축성, 정상상태의 유체이며, 물리적 성질로서 밀도 $\rho = 998 \text{ kg/m}^3$, 점도는 $\mu = 1 \times 10^{-9} \text{ N}\cdot\text{s/mm}^2$ 라고 가정하였다. 시뮬레이션 결과, 공기 주입량에 따른 배양액의 유속변화로부터 배양초기에는 300 mL/min, 20일 경과 후에는 400 mL/min, 40일 경과 후에는 500 mL/min, 60일 경과 후에는 600 mL/min, 그리고 80일 경과 후부터는 700 mL/min의 공기를 주입시켜주는 것이 각각의 배양기간에 따른 나리구근 간의 배열이 균일한 것으로 나타났다.

Figure 5는 주입공기량 제어장치를 나타낸다. 바이오리액터 내부로 적량의 공기를 주입시키기 위한 공기유량계, 공

Table 1. Simulation conditions of air-flowrate.

Cultivation stage	Cultivation lapsed time	Size of a bulblet	Position of the ball within a bioreactor
Step 1	The inoculated day	5 mm	Floating (upper layer)
2	20 days after inoculating	7 mm	Floating (upper and middle layer)
3	40 days after inoculating	10 mm	upper · middle · lower
4	60 days after inoculating	15 mm	middle and lower layer
5	80 days after inoculating	20 mm	lower layer

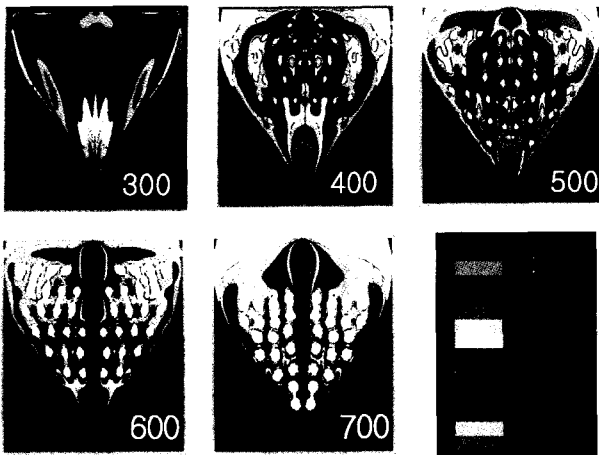


Figure 4. The results of simulation. The color expresses the flow velocity and a unit is cm/s.

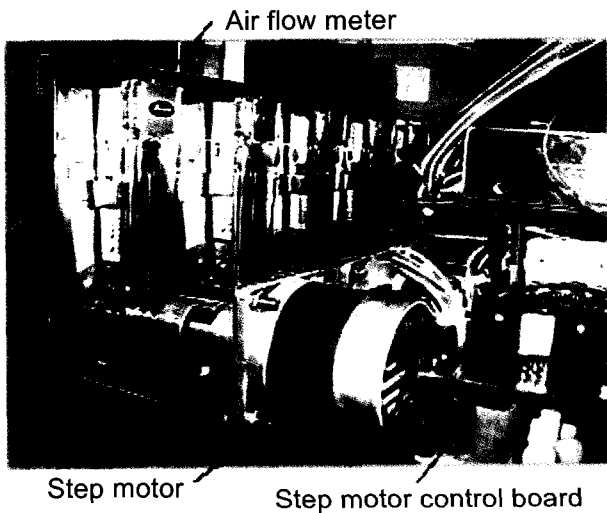


Figure 5. The control device of the air flowrate.

기유량계 밸브의 회전을 제어하기 위하여 밸브와 직결된 스텝모터와 모터 제어부, 에어펌프 및 이들을 통합하여 제어하는 제어용 컴퓨터 등으로 구성 하였다.

오염경보장치의 구성

조직배양에서 가장 주의하여야 할 점 중의 하나가 배양 후 오염을 최대한으로 줄여야 하는 것이다. 오염의 원인으로서는 배양 대상 재료의 살균이 불완전하였거나, 배양 재료 내부에 존재하는 내생균 등의 배양 재료에서 기인하는 오염과 배양도구나 배양용기의 멸균이 불완전하여 발생하는 것으로 나눌 수 있다. 배양재료나 배양액에서 오염이 발생하면 배양액에서 거품이 생기고 냄새가 나는 것 이외에도 배양액의 pH 농도에도 영향을 미치게 된다. 그러나 기내배양에서 육안으로 오염 감염여부를 신속히 판단하기는 어려우므로, 본 연구에서는 pH의 농도변화로부터 오염감염 여부를 신속히 판단하여 효율적인 배양이 이루어지도록

하였다.

배양액의 농도변화 및 시스템의 제어성능

관행적으로 배양할 때의 배양경과에 따른 배양액 pH, DO 농도의 변화와 pH 농도와 주입공기량을 제어하였을때의 농도변화를 제작된 바이오리액터 제어시스템을 이용하여 on-line으로 측정하였다. 경시간격별 배양액의 측정에 사용된 공시작물은 Oriental hybrid 'Casa Blanca'로 국내에서 가장 많이 재배되고 있는 나리품종중 하나이다. 본 연구에서는 Casa Blanca 구근의 비대배양에 바이오리액터를 사용하였으며, 배양기간은 통상 4개월 정도 소요된다. 배양 배지는 MS기본배지에 sucrose 6%, 활성탄 1%를 첨가하여 암환경에서 배양하였다.

결과 및 고찰

시스템의 제어성능

시작 시스템을 이용하여 pH농도를 목표값으로 제어하기 위하여, 산·염기 공급 펌프의 구동시간에 따른 제어 성능의 평가 결과를 Figure 6에 나타낸다. Figure 6내의 A, B, C가 나타내는 숫자는 펌프의 구동시간이며, 시작 시스템에서는 공급펌프의 구동을 스텝 모터를 이용하기 때문에 모터의 기동시간에 정비례하는 회전수의 제어로 항상 일정한 량의 산·염기가 공급되도록 하였다. 구동시간은 0.1초 단위로 설정이 가능하며, 0.1초당 토출량은 0.01 mL (± 0.002)이다. 또한 계측 전극의 안정된 측정을 위하여 10초 이상의 계측시간을 필요로 한다. 시험은 바이오리액터 배양액의 pH농도를 인위적으로 3.8로 고정시킨 후, 제어 시스템을 이용하여 pH 농도를 5.8±0.2로 제어하는데 소요되는 시간을 펌프 구동시간별로 조사하였다.

시험의 결과 Table 2에 나타낸 것과 같이 pH 3.8에서 5.8로 제어하는데 A, B, C 각각 13분 20초, 19분 50초, 25분이 소요되었으며, 제어를 위해 투입된 NaOH 및 HCl의 량은 A의 경우 각각 12.2, 1.3 mL, B는 10.4, 0.3 mL, C는

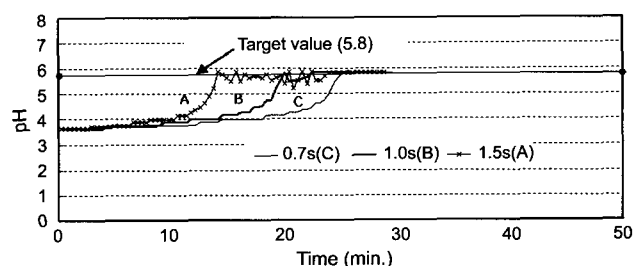


Figure 6. The control performance by the drive time of the pouring pump of an acid & base.

Table 2. The condition of pH concentration control using the system.

Item	Driving time of pump(s)/ The amount of pourings of an acid base (mL)	required control time	pouring amount (mL)	
			NaOH	HCl
A	1.5 s/0.15 mL	13' 20"	11.2	1.3
B	1.0 s/0.1 mL	19' 50"	10.4	0.3
C	0.7 s/0.07 mL	25' 05"	9.8	-

NaOH만 9.8 mL 투입되어 제어되었다. 이상의 결과로부터 시작 시스템을 이용하여 배양액에 투입되는 NaOH 및 HCl의 량을 최소한으로 하면서 가능한 한 빠른 시간 내에 안정적으로 pH 농도를 제어하기 위해 계측시간 10초, 1회 펌프 구동시간 1.0초로 하는 것이 좋은 것으로 판단되었다.

배양액의 농도변화

배양 경과에 따른 pH와 DO 농도는 바이오리액터 내에 주입된 전극을 통하여 on-line으로 계측하였으며, Figure 7에 계측결과를 나타낸다. 배양기간은 총 4개월로 배양개시 후 2개월째 배양액을 교체하여 배양하였다.

Figure 7에서와 같이 관행구에서 배양액의 pH 농도는 배양초기 5.2에서 배양 1개월 후에는 3.6까지 감소한 후 2개월째까지 유지되는 경향을 보였으며, 배양액을 교체한 후 4일간 4.7에서 급격히 3.5까지 감소하여 4개월째까지 유지되는 것으로 나타났다. 또한 관행구에서 주입공기량은 배양 전기간에 걸쳐 500 mL/min으로 항상 일정하며, 이 때의 DO농도의 변화는 Figure 7에서 나타낸 것과 같이 배양초기 6.5 ppm에서 서서히 떨어져 2개월후에는 3.8 ppm까지 떨어졌으며, 배양액 교체 후 배양조직의 성장에 따라 호흡이 많이 이루어져 90일째에는 2.5 ppm 까지 떨어지는 것으로 나타났다. 반면 제어구에서 pH 농도는 Figure 7과 같이 제어 목표값인 5.5±0.5 범위내에서 원만하게 제어를 할 수 있었으며, DO 농도의 변화는 배양 2개월째 까지는 관행구와 큰 차이가 없이 비슷한 경향을 보였으나, 배양후기로 진행될수록 관행구에 비해 많은 공기가 주입되어 용존산소량이 높은 것으로 관찰되었다.

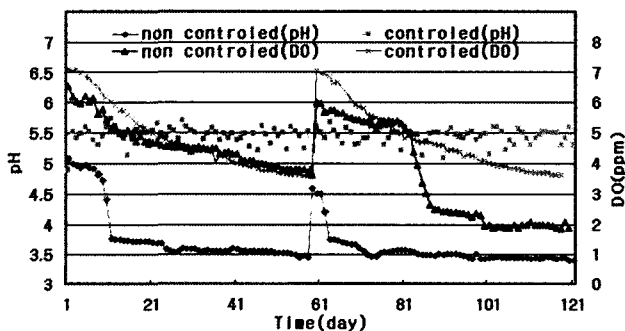


Figure 7. Change of pH & DO concentration of culture.

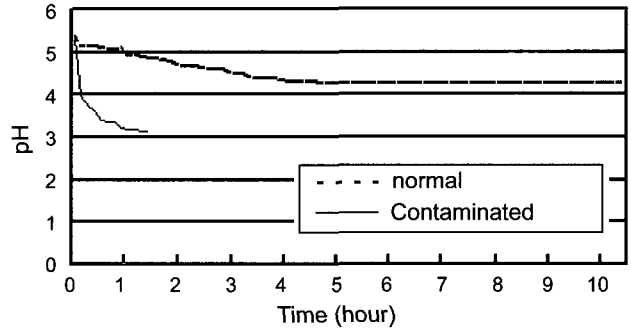


Figure 8. Changes of pH in the contaminated mediums.

오염발생시 농도변화

Figure 8은 배양액에 오염이 발생하였을때의 pH 농도의 변화를 나타내고 있다. 정상적으로 배양될 때와는 달리 오염이 발생한 실험구에서는 pH 농도가 급격히 떨어지고 있음을 알 수 있다.

오염에 의해서 균이 증식을 시작한 후 2시간 이내에 배양액의 pH 농도는 급격하게 떨어져 정상상태에서의 배양과 구별되었다. 일반적으로 배양액에는 활성탄이 첨가되어 있어 육안으로 오염감염 여부를 판단하기 어려우므로 배양개시 후 2~4주일이 지난 후 냄새와 부유물 등으로 오염감염 여부를 판단할 수 있으나, pH 농도의 급격한 변화로부터 오염감염의 여부를 사전에 미리 파악할 수 있을 것으로 나타났다.

적 요

식물조직배양용 바이오리액터 8개의 배양액 pH, DO 농도를 on-line으로 계측하고 pH 농도 및 주입공기량을 제어할 수 있는 시스템을 개발하였다. 시스템 제어용 컴퓨터 프로그램은 나리구근의 성장단계에 맞는 주입공기량을 추종 제어방식으로 제어하며, 바이오리액터 내부의 pH 변화를 감지하여 오염을 감시하는 오염경보기능이 포함되어있다. 성장단계에 따라 적절한 주입공기량의 선정을 위하여 시뮬레이션 한 결과 배양초기에는 300 cc/min, 20일 경과 후에는 400 cc/min, 40일 경과 후에는 500 cc/min, 60일 경과 후에는 600 cc/min, 그리고 80일 경과 후부터는 700 cc/min의 공기를 주입할 경우 바이오리액터내 나리구근의 분포가

고르게 나타났으며, 이 결과를 바이오리액터 배양실험에 이용하였다. 배양액의 pH 농도 제어 시스템은 배양 전 기간 동안에 제어 목표값 (5.5 ± 0.5)로 제어할 수 있었다.

인용문헌

Aitken-Christie J, Kozai T, Smith MALS (1995) Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture. Kluwer Academic Publishers, Boston, pp 87-123

Kang C, Chung SH, Han G, Kwon K, Yun GH, Choi H (2002) Survey on the Cultivation Process of Plant Tissue Culture. Proceedings of the Korean Society for Agricultural Machinery Winter Conference. Suwon, Korea, 7: 401-406

Nagaoka M (1991) Bio-nursery system. SHITA Report 1: 50-55

Takahashi S (1993) Bio-nursery system and results of environment control. Proceedings of Symposium on Environment Control and Effect of Plant Tissue Culture, Chiba, Japan. pp 8-13

(접수일자 2004년 9월 10일, 수리일자 2004년 12월 17일)