식물조직배양용 바이오리액터의 환경제어 시스템의 개발

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

정석현* 강창호* 권기영* 한길수* 이기명** 한봉희***

정회원 정회원 정회원 정회원 정회원

S.H. Chung C.H. Kang G.Y.Kwon K.S. Han K.M. Lee B.H. Han

1. 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 한천배지를 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 비해 대규모화 및 자동화가 가능하여 생산비의 절감과 생산능률의 향상이 가능하리라 생각된다.

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, 국내에서는 임업연구원에서의 산삼배양, 충북대학교에서의 거베라 및 인삼 대량증식에 바이오리액터를 이용한 연구가 수행되었다. 본 연구에서는 바이오리액터를 이용하여 나리구근의 대량생산을 검토하기 위하여 바이오리액터내 배양액의 pH, DO의 농도를 온라인으로 제어할 수 있는 시스템을 시작하였으며, 실제 배양시 배양경과에 따른 배양액의 농도변화를 계측하였다.

* 농촌진흥청 농업기계화연구소

** 경북대학교 농업기계공학과

*** 농촌진흥청 원예연구소

2. 재료 및 방법

가. 시스템의 구성

식물조직배양에 있어서 식물조직의 물리적, 생리적 특성상 발효 등에 이용되는 바이오리액터를 그대로 사용하는데는 상당한 문제점들이 있다. 특히 식물조직은 물리적 충격에 약하여 기계적 교반을 하기가 곤란하므로 공기부양 형식의 배양기가 필요하다. 그림 1은 시작 시스템의 개요를 나타낸다.

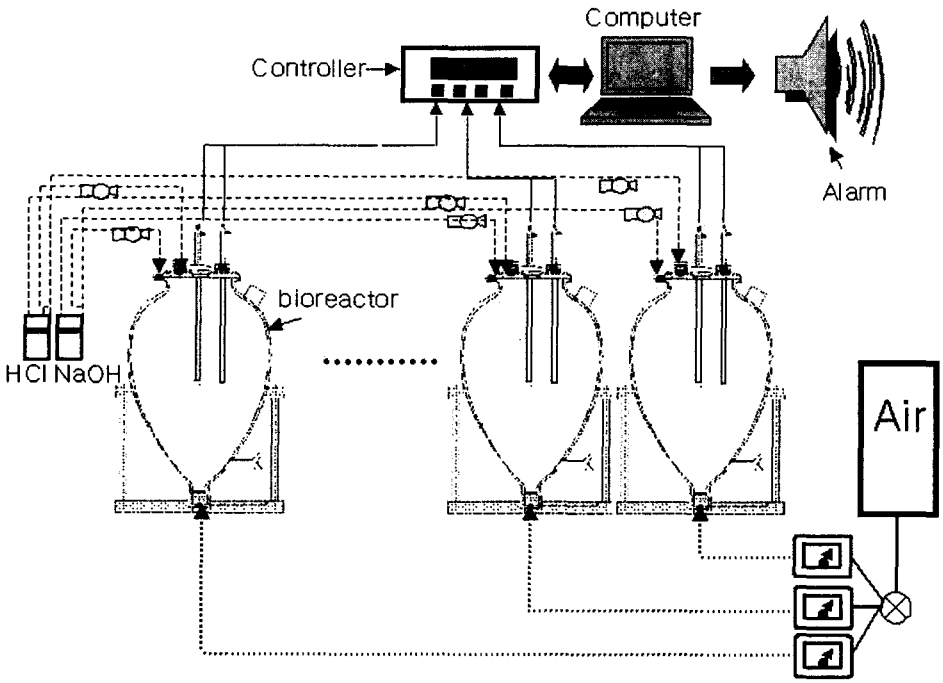


Fig. 1. Schematic diagram of an automated control system of bioreactor

그림에서와 같이 시작시스템은 하나의 제어시스템으로 여러 대의 바이오리액터를 동시에 제어할 수 있도록 구성하였다. 본 연구에 이용한 바이오리액터는 콘타입 형상으로 용량은 20ℓ이며 고압멸균이 가능하도록 pyrex 재질로 제작한 것을 채택하였다.

(1) 계측부

pH 와 DO 농도의 계측은 각 바이오리액터내에 전극을 삽입하고 전극으로부터의 신호를 아날로그 멀티플렉서를 통해서 하나의 트랜스미터에서 신호를 처리하였다. pH 전극은 2~12, DO 전극은 0~20ppm 의 범위에서 측정이 가능하며 양 전극 모두 고압멸균(121℃, 40분, 2bar)의 공정에서도 내구성을 가지며, 연속적으로 4개월 이상 사용할 수 있는 것을 선

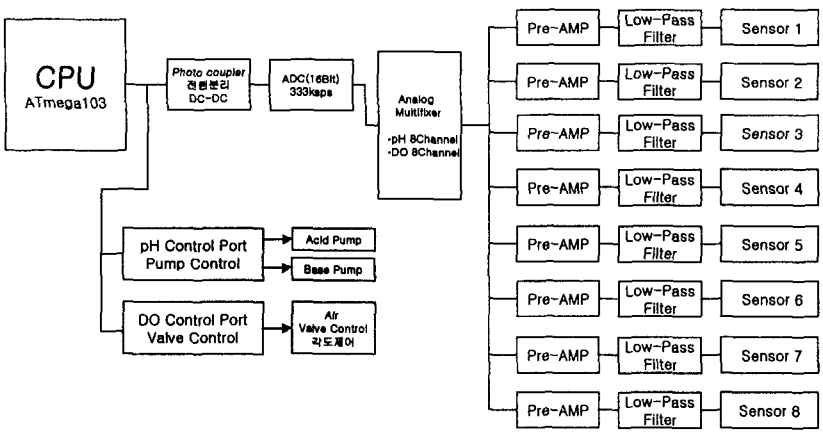


Fig. 2. Block diagram of measurement

택하였다. 그림 2는 pH 및 DO 의 측정구조를 나타낸 것이다.

(2) 제어부

(가) pH 제어

pH의 제어는 그림 3과 같이 사전에 프로그램화된 설정값과 측정된 값을 비교하여 산(HCl, 0.1N)과 염기(NaOH, 0.1N) 용액을 바이오리액터내로 주입하여 제어하도록 하였다. 산·염기 용액주입용 펌프에는 스테핑 모터를 사용한 정량펌프를 이용하여 설정시간만큼 산·염기 용액이 주입되도록 하였다. 설정값은 하한값과 상한값을 설정하여 그 범위내에서 항상 유지되도록 하였으며, 그림과 같이 전극으로부터 측정된 바이오리액터내의 pH값이 설정범위내에 있지 않으며 동시에 계측값이 설정 하한값 이하일 경우에는 염기 공급 정량펌프를 구동하여 염기를 공급하게 되고 설정 상한값 이상일 경우에는 산 공급 정량펌프를 구동시켜 설정범위내에서 항상 일정하게 pH 값을 유지하도록 하였다.

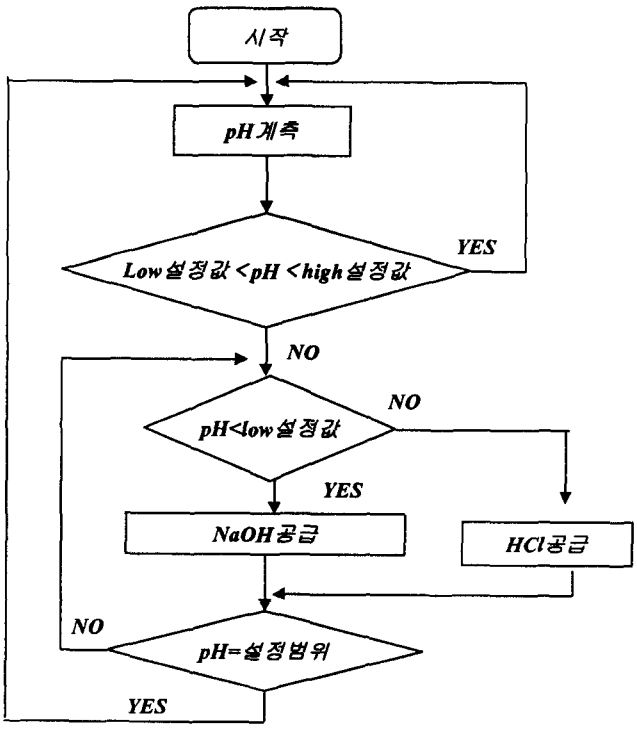


Fig. 3. Flowchart of the pH control

(나) DO 제어

바이오리액터내의 용존산소량의 제어는 자동제어의 분류상 목표값을 고정시키지 않고 배양조직의 생장에 따라서 변화하는 추종제어 개념을 도입할 필요가 있다. 또한 생장을 지속시킬 수 있는 하한 용존산소량과 공기부양에 따른 물리적 스트레스를 최소화할 수 있는 공기 주입량을 고려하여야한다. 따라서 배양기간의 경과에 따른 생장량을 추정하여 그 시점에서의 적당한 공기 주입량을 결정한

후, 공기량 조절밸브를 제어하여 주입 공기량을 제어하도록 하였다.

나. 배양액 성분계측

(1) 공시재료

배양시 배양액의 pH, DO 농도를 제어하기에 앞서 관행적으로 배양할 때의 배양경과에 따른 배양액의 성분을 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.

(2) 측정방법

배양액 성분중 pH와 DO는 시작 시스템을 이용하여 on-line으로 측정하였으며, 무기이온성분은 배양액을 샘플링하여 측정하였다. 측정 무기이온은 구근의 비대에 많은 영향을 끼치는 암모니아태 질소, 질산태 질소를 중심으로 측정하였으며 각각 Indophenol blue 법, 자외선 흡광도 법을 이용하여 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 배양액 성분계측

배양 경과에 따른 경시간격별 농도의 계측을 위해서 pH와 DO 농도는 바이오리액터내에 주입된 전극을 통하여 on-line으로 계측하였으며, 주요 무기이온성분은 1개월 간격으로 샘플링하여 측정 분석하였다.

그림 4와 5는 실제배양시 pH와 DO의 농도변화를 나타낸다.

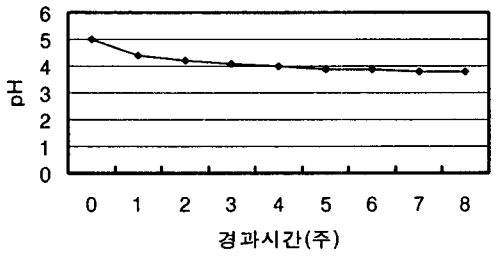


Fig. 4. Changes of pH in the mediums

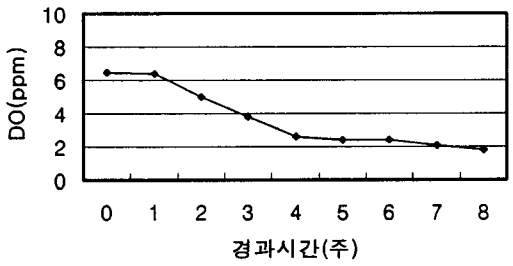
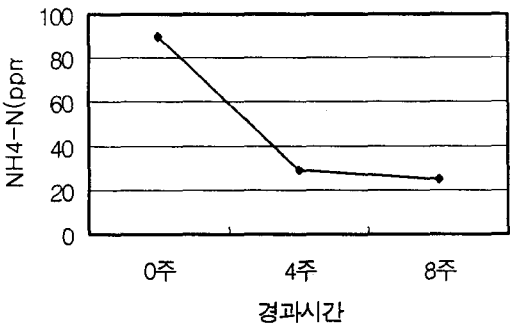


Fig. 5. Changes of DO in the mediums

그림에서와 같이 배양액의 pH 농도는 배양초기 5.0에서 서서히 감소하여 8주후에는 3.8까지 떨어졌다. 나리구근의 배양에서 최적 pH 농도는 5.0~6.0이며, 통상 배지의 조제시에는 pH 농도를 5.8로 조절하지만, 배지의 조제시 활성탄을 첨가하고 고압멸균 공정을 거치는 과정에서 pH 농도가 배지조제시보다 약간 떨어지는 것으로 나타났다. 또한 배양액의 DO 농도는 배양 초기 6.2ppm에서 8주후에는 2ppm까지 감소하였다.

그림 6과 7은 암모니아태 질소와 질산태 질소의 농도변화를 계측한 결과이다.



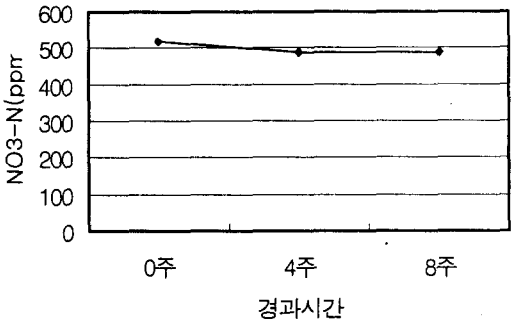


Fig. 6. Changes of NH_4^+ in the mediums Fig. 7. Changes of NO_3^- in the mediums

그림에서와 같이 암모니아태 질소의 경우 배양초기 90ppm에서 4주후에는 29ppm, 그리고 8주후에는 22ppm으로 변화하여 배양개시 후 4주까지 왕성하게 흡수되다가 그후로는 흡수되는 양이 줄어드는 것으로 나타났다. 질산태 질소의 경우 배양초기 510ppm에서 4주후 490ppm, 8주후 480ppm으로 암모니아태 질소에 비해서 많은 흡수가 이루어지지 않아, 나리구근의 비대에는 암모니아태 질소성분이 많은 영향을 미치는 것으로 추정된다. 또한 배양초기에 암모니아태 질소의 흡수가 질산태 질소보다 많이 이루어져 구근으로부터 H^+이온을 유출시킴으로 pH의 값이 떨어지는 것으로 나타났다.

나. 오염발생시 농도변화

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

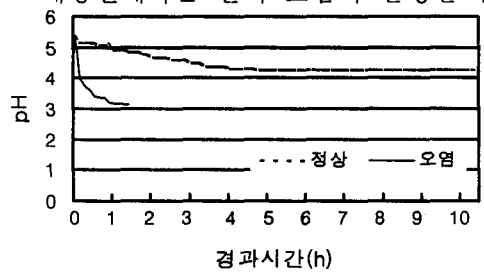


Fig. 8. Changes of pH in the contaminated mediums

오염에 의해서 균이 증식을 시작한 후 1시간 이내에 배양액의 pH 농도는 급격하게 떨어져 정상상태에서의 배양과 뚜렷히 구별되었다. 배양액에는 활성탄이 첨가되어 있어 육안으로 오염감염 여부를 판단하기 이해서는 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.

5. 적요

식물조직배양용 바이오리액터내 배양액의 pH, DO 농도를 on-line으로 계측하고 제어하기 위한 시스템을 개발하여 시스템의 성능시험과 경시간격별 배양액의 농도변화를 계측하였으며, 주요 연구결과는 다음과 같다.

가. 복수의 바이오리액터내 배양액의 pH, DO 농도를 전극을 이용하여 on-line으로 계측하며, 농도의 계측값과 목표값을 비교하여 피드백으로 제어할 수 있는 시스템을 개발하였다.

나. 배양액의 농도변화를 계측한 결과 pH는 배양초기 5.0에서 배양이 경과됨에 따라 서서히 떨어져 2개월 후에는 3.8까지 떨어지는 것으로 나타났다.

다. 배양액의 성분중 배양초기에는 암모니아태 질소의 흡수가 질산태 질소보다 많이 이루어져 구근으로부터 H^+이온을 유출시킴으로 pH의 값이 떨어지는 것으로 나타났다.

라. 오염이 발생한 리액터내의 배양액 성분은 pH의 값이 3이하로 떨어졌으며, 이로부터 배양액의 오염경보를 할 수 있는 것으로 나타났다.

참고문헌

1. 강창호 외, 2002, 식물조직 배양공정의 기계화를 위한 실태분석, 한국농업기계학회 동계학술대회 7(1), 401~406
2. 高橋滋, 1993, バイオリアクタ利用における環境調節とその効果, 植物組織培養における環境調節とその効果シンポジウム, 8~13
3. 長岡正昭, 1991, バイオナーサリーシステムと関聯技術開発の現況と展望, SHITA REPORT No.1, 50~55
4. Toyoki Kozai, 1995, Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture, 87~123