

생물반응기를 이용한 인삼류의 청정배양

손 성 호
(주)비트로시스

I. 서 언

예로부터 식물은 인간에게 유용한 많은 천연물질의 공급원으로 이들로 부터 생산되는 물질들은 의약품, 식품 그리고 화장품 등의 용도로 사용되어 왔다. 유용한 천연물질을 식물체에서 직접 얻는 데는 그 식물체가 희귀종이거나 생장이 느린 경우, 그리고 자연환경에 따라 천연물질의 조성이 변하거나 생산량이 감소하는 경우 등 여러 가지 문제점이 있다. 이러한 문제점은 “식물조직배양기술(Plant Tissue Culture Technology)”을 이용하여 해결할 수 있는데, 이것은 식물체로부터 유도된 세포와 조직을 무균조건하의 영양배지에서 배양하는 기술을 뜻한다. 식물은 식물 세포의 조직이 세포전체의 형태를 형성하거나 식물체를 재생하는 능력인 “전형성능(Totipotency)”을 가지고 있고 이러한 식물의 잠재적인 능력을 이용하여 조직배양이라는 특수한 환경에서 배지에 여러 가지 식물호르몬을 처리함으로써 실험자의 목적에 맞는 다양한 실험이 가능해진다.

식물조직배양을 이용하여 유용물질을 생산하기 위해서는 대량배양(Mass Production) 기술이 필요하며, 여기에 생물반응기(Bioreactor)가 사용되어진다. 생물반응기는 특정 물질이나 세포를 생산하기 위한 목적과 특정 반응을 수행하기 위한 목적으로 인위

적으로 조절된 환경하에서 생물체를 배양할 수 있도록 만든 용기를 일컫는다. 식물의 조직배양체를 이용하여 유용물질을 생산하려면 먼저 생산성이 높은 세포주를 선발해야 하고, 배지조성, pH, 온도, 빛 등 외부인자들의 조건을 최적화하는 과정을 수행해야 한다. 이런 조건이 만족되면 공정에 적합하고 조직배양체의 성장과 유용물질 생산에 적절한 생물반응기를 선택하여야 하는데, shear에 민감한 식물 조직배양체의 특성과 산소 공급이 원활히 될 수 있는지의 여부도 검토되어야 한다.

따라서 적당한 생물반응기를 선택하기 위해서는 생물체 및 생산물의 생물학적, 생화학적, 물리/화학적 특성 뿐만 아니라 이러한 특성에 따른 전체 공정의 설계와 생산물의 사업화까지도 고려되어야 한다. 최종 산물의 경제성 및 경쟁력을 좌우하는 최적 생산조건을 확립함에 있어서 여러 조건들이 상호 보완적으로 작용할 수 있는 적절한 반응기의 신중한 선택이 중요하다고 할 수 있다.

1. 식물조직배양 기술

예로부터 식물은 인간에게 유용한 많은 천연물질의 공급원으로 이들로 부터 생산되는 물질들은 의약

품, 식품 그리고 화장품 등의 용도로 사용되어 왔다. 유용한 천연물질을 식물체에서 직접 얻는다는 그 식물체가 희귀종이거나 생장이 느린 경우, 그리고 자연환경에 따라 천연물질의 조성이 변하거나 생산량이 감소하는 경우 등 여러 가지 문제점이 있다. 이러한 문제점은 “식물조직배양기술(Plant Tissue Culture Technology)”을 이용하여 해결할 수 있는데, 이것은 식물체로부터 유도된 세포와 조직을 무균조건하의 영양배지에서 배양하는 기술을 뜻한다. 식물은 식물 세포의 조직이 세포전체의 형태를 형성하거나 식물체를 재생하는 능력인 “전형성능(Totipotency)”을 가지고 있고 이러한 식물의 잠재적인 능력을 이용하여 조직배양이라는 특수한 환경에서 배지에 여러 가지 식물호르몬(Auxin, Cytokinin, Gibberellin, Abscisic acid, Ethylene)을 처리함으로써 실험자의 목적에 맞는 다양한 실험이 가능해진다.

식물조직배양을 이용하여 유용물질을 생산하기 위해서는 대량배양(Mass Production) 기술이 필요하며, 여기에 생물반응기(Bioreactor)가 사용되어진다. 식물의 조직배양체를 이용하여 유용물질을 생산하려면 먼저 생산성이 높은 세포주를 선발해야 하고, 배지조성, pH, 온도, 빛 등의 외부인자들의 조건을 최적화하는 과정을 수행해야 한다. 이런 조건이 만족되면 공정에 적합하고 조직배양체의 성장과 유용물질 생산량에 적절한 생물반응기를 선택하여야 하는데, shear에 민감한 식물 조직배양체의 특성과 산소 공급이 원활히 될 수 있는지의 여부도 검토되어야 한다.

식물조직배양용 배지는 생장에 필요한 대량원소, 미량원소, 비타민 그리고 당을 포함하고 있으며, 비교적 저렴한 비용으로 제조할 수 있고, 단백질이 거의 포함되어 있지 않아 식물체로부터 단백질의 분리/정제가 용이하다. 또한 동물세포 배양에 비해 상대적으로 대량배양이 쉬운 편이며, 바이러스나 독소에 의한 위험성이 없어 안전한 원료의 생산이 가능하다는 장점도 갖는다.

2. 생물반응기의 정의

생물반응기는 특정 물질이나 세포를 생산하기 위한 목적과 특정 반응을 수행하기 위한 목적으로 인위적으로 조절된 환경하에서 생물체를 배양할 수 있도록 만든 용기를 일컫는다. 따라서 적당한 생물반응기를 선택하기 위해서는 생물체 및 생산물의 생물학적, 생화학적, 물리/화학적 특성 뿐만 아니라 이러한 특성에 따른 전체 공정의 설계와 생산물의 사업화까지도 고려되어야 한다. 최종 산물의 경제성 및 경쟁력을 좌우하는 최적 생산조건을 확립함에 있어서 여러 조건들이 상호 보완적으로 작용할 수 있는 적절한 반응기의 신중한 선택이 중요하다고 할 수 있다.

3. 생물반응기의 분류

생물반응기는 하드웨어적인 측면으로 분류하면 교반식, 회전식, air-lift형, 충전탑형, 막형 반응기 등으로 나눌 수 있고, 그 중 air-lift형은 shear가 낮은 반면 mixing에 문제가 있어 고농도 배양에는 적합하지 않는 특징을 가지고 있다.

운용방식에 따라 분류하면 회분식(batch), 연속식(continuous), 유가배양식(fed-batch) 등으로 구분할 수 있다. 회분식 배양기는 배양이 완전히 끝난 후 다시 배지를 교체하는 방식으로 초기에 한번 배지를 채운 후 배양이 끝날 때까지 더 이상 영양물질을 공급하거나 제거하지 않는 배양기를 말한다. 이러한 회분식 배양기는 배양 시작 후 일정한 시간이 지나면 세포가 성장을 멈추고 그 후 기질이 더 이상 소비되지 않음과 동시에 생성물도 만들어지지 않는다. 연속식 배양기에서는 새로운 배지가 계속적으로 공급되며 동시에 세포가 배양기로부터 빠져 나온다. 따라서 연속식 배양기에 있어서는 생장

(growth)과 생산(production)이 오랫동안 유지될 수 있다. 연속식 배양기가 정상상태(steady state)에 도달하면 세포, 생성물, 기질의 농도가 일정하게 유지된다.

그리고 규모에 따라서는 크게 실험실용(1~30L), Pilot용(150~3,000L), 그리고 톤 단위의 생산시설용 반응기 등으로 나눌 수 있다. Lab scale은 배양 대상에 있어서 범용으로 사용할 수 있고 고난도의 기술이 요구되지 않으면서 대량생산이 가능하다. Pilot scale은 실험단계에서 얻어진 데이터를 기초로 하여 최적의 환경을 제공할 수 있도록 기능적 특성을 부가시키므로 범용으로 생산하기 어려우며, 배양기술에 대한 전반적인 기술과 know-how가 요구되고 대부분 주문 생산방식으로 제작되는 비교적 고가의 기기라고 할 수 있다.

생물반응기의 상업적 이용은 생물체를 생산하는 것, 세포를 이용하여 효소나 대사물을 생산하여 세포내부 또는 외부에 축적하는 것, 그리고 세포를 이용하여 전구체를 원하는 산물로 바꾸는 생물전환의 크게 세 가지로 나눌 수 있다.

따라서 생물반응기를 이용한 식물조직배양에 있어서 그 구조 및 설비공정에 따라 최종 결과물의 품질과 경제성에 큰 차이가 있을 수 있으므로 배양체의 종류 및 용도에 맞는 특성화된 생물반응기 선택의 중요성은 크다고 할 수 있다.

4. 대량생산

대량생산을 위한 배양에서는 scale-up에 따른 여러 가지 원인으로 실험실 수준에서는 성장과 생산이 잘 되던 것들이 scale-up 후에 생장이 더더거지거나 목적하는 물질의 생산량이 감소하는 등의 문제점이 자주 발생하게 된다. 이것은 배양 환경의 변화에 기인하는 것이므로 pilot 규모나 생산 규모의 생물반응

기의 운전 최적화를 통해 해결되어야 할 부분들이다.

또한 실험실 수준의 생물반응기와 달리 대량생산 규모의 생물반응기는 배지의 멸균(열전달), 배양(생물반응기 운전), 산소전달, mixing 등의 과정이 연속적으로 이어진 관을 통하여 이루어지게 되므로 그 구조가 복잡할 뿐만 아니라 배양을 위한 운전에도 있어서도 숙련도가 요구된다. 이것이 갖추어지지 않으면 오염으로 인한 성장 및 생산성 저하로 인해 막대한 손실이 발생할 수 있게 된다.

5. 국내외의 생물반응기 활용

세계시장에서 생물반응기가 활용되는 분야는 2000년 기준으로 화학물질(135억 달러), 의약품(120억 달러), 에너지(180억 달러), 식품(180억 달러), 농산물(225억 달러) 수준으로 알려져 있다.

일본에서는 최초로 지치(*Lithospermum erythrochizon*)로부터 의약품, 식품 및 화장품의 색소로 사용할 수 있는 시코닌(Shikonin)을 상업화 생산한 이후, 주목나무로부터 항암제 Taxol의 대량생산 등 산업적 응용 연구를 통해 현재는 보편적인 기술로 인정받게 되었다.

국내의 경우 생물반응기는 미생물이나 식물세포, 동물세포 등의 생명체를 이용하여 고부가가치의 원료를 생산하는 생명공학 분야의 필수 장비로서 과거에는 발효기라는 이름으로 알려져 효소, 아미노산, 자일리톨 발효에 사용되었다.

6. 생물반응기를 이용한 인삼류의 청정배양

인삼의 뿌리는 수천년 동안 동양에서 소화기 질환, 혈액순환 및 원기회복을 원활하게 하기 위한 중

요한 의약품으로 사용되어 왔다. 인삼의 재배방법은 오래전에 확립되었으나, 생육에 오랜 시간이 소요되기 때문에 재배가 어렵고 병충해에도 쉽게 피해를 입었다. 이러한 이유로 식물세포배양 기술을 이용한 인삼의 대규모 생산은 1998년 이래 일본 Nitto Denko사에 의하여 시도되었다. 생산성은 20~25톤 발효조에서 4주간 배양하여 건조중량으로 약 20g/L에 달하였다. 이것을 이용한 몇 가지 건강식품이 일본에서 판매되고 있다.

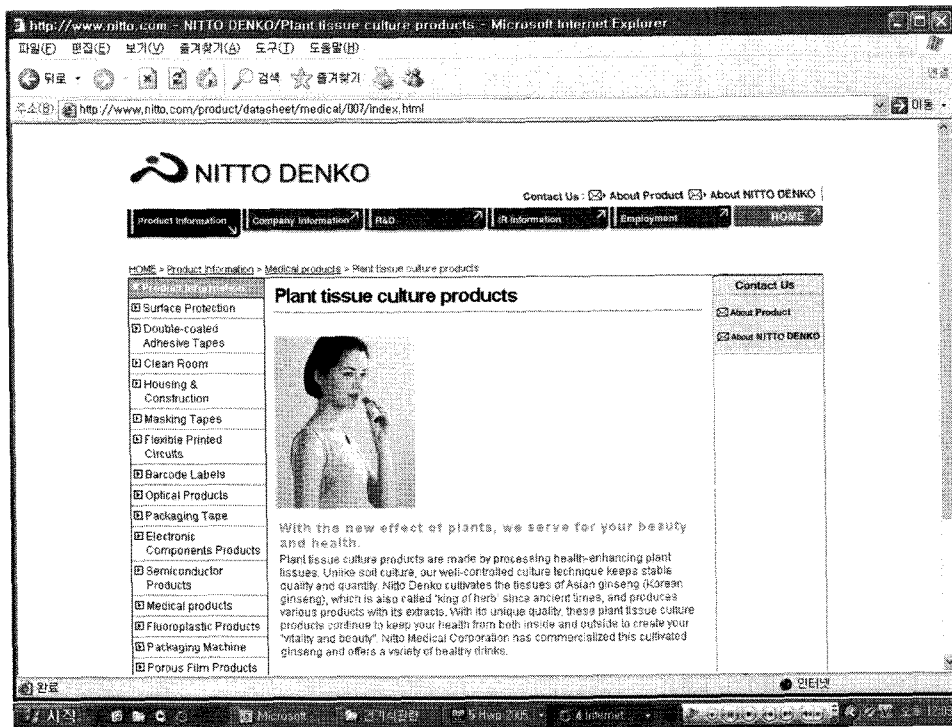
마지막으로 생물반응기를 이용하여 산삼배양근의 산업화에 성공한 예를 설명하고자 한다. 산삼(Panax ginseng C. A. Meyer)은 두릅나무과에 속하는 다년생 초본식물로 오래전부터 알려진 약효에 비해 자생하는 수가 극히 적고, 장기 휴면 특성에 의해 쉽게 발견 되지 않는 등 쉽게 이용할 수 없는 식물 중 대표적인 예이다. 따라서 이러한 산삼을 대중화하기 위하여 식물조직배양 기술을 이용해 산삼배양근을 생산하여 사업화하였다. 생물반응기를 이용한

일본의 인삼세포배양 사용현황 : Nitto Denko Corp.

식물세포 및 조직배양체(PCTC)의 안전성검사 결과

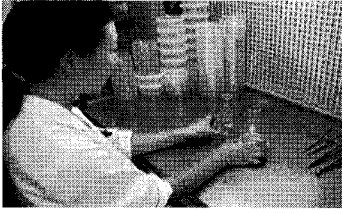


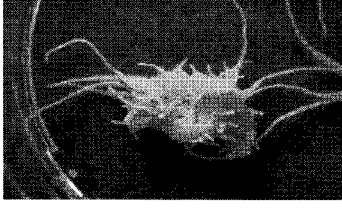
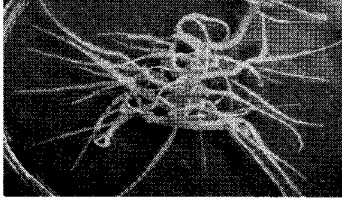
- ① 식물세포 배양체를 실험용 쥐를 이용하여 급성 혹은 만성독성을 실험한 결과 무독한 것으로 나타남.
- ② Chinese hamster 세포로 Ames testsk 염색체 분석시 돌연변이 유발성이 나타나지 않았다.
- ③ 재배삼과 세포배양 인삼에 대한 독성검사 결과 무독한 것으로 나타났다.
- ④ 화학성분 검정에 있어서 재배삼과 배양인삼의 경우 동일한 것으로 판정 되었다.

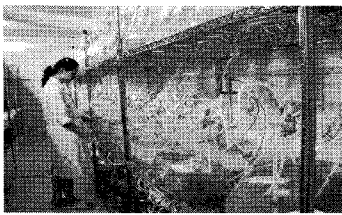
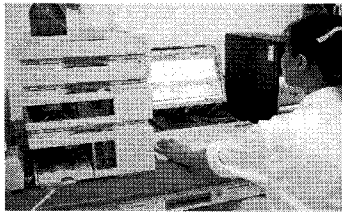
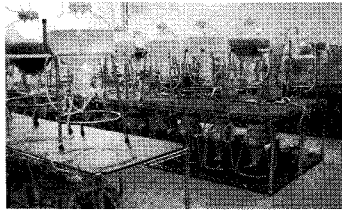

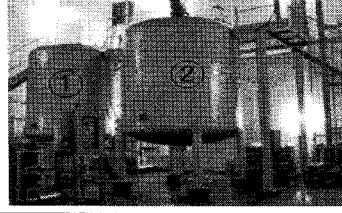
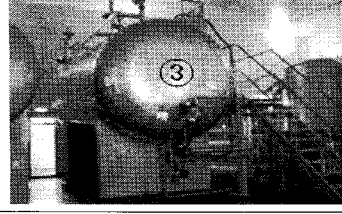
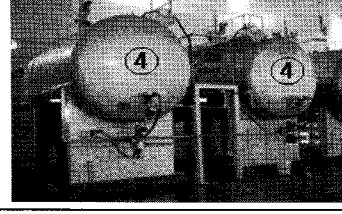
Nitto Denko 사 홈페이지

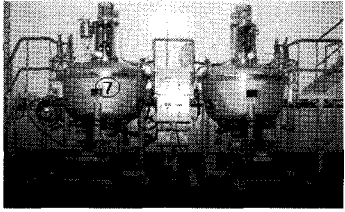

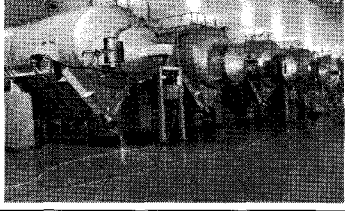
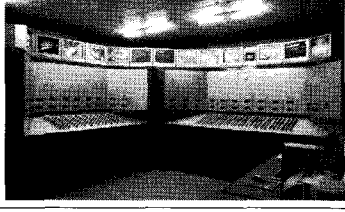



산삼배양근의 생산은 충분히 부가가치가 높으며, 생물반응기에서 생산 비용이 비교적 높다고 하더라도 자연계에서 수십년의 세월과 한정된 생육환경을 필요로 하는 것에 비하면 생산비용은 결코 높은 것이 아니라고 생각된다. 조직배양을 이용하여 생산

된 산삼배양근은 기상, 병충해 및 계절적 변화 등 환경요인의 영향을 받지 않으며, 재배가 어려운 식물체가 조절된 조건의 무균상태에서 배양되어지기 때문에 중금속과 잔류농약 등의 오염이 없는 청정 배양된 친환경 농산물로 생산할 수 있다.

생물반응기를 이용한 산삼배양근 생산 과정		
1. 원료 산삼시료의 조제		산삼시료를 1차 세척하여 부위별로 절단한 후 알코올, 소독제, 멸균수로 30분간 무균 소독한다.
		소독된 시료를 무균접시에 올려 각 조직부위별로 적당한 크기로 절단한 후 영양배지가 담긴 배양용기에 옮긴다.
		
2. 산삼 배양근 부정근 유도		배지에 옮긴 조직을 암상태, 적정온도의 배양실에서 약 1달동안 배양하면 산삼배양근(세근)이 유도된다.
		유도된 산삼배양근을 한달마다 새 영양배지로 옮겨준다. (약 6개월 이상)

생물반응기를 이용한 산삼배양근 생산 과정		
3. 고생장, 사포닌 고함유 산삼배양근 의 선발		유도된 산삼배양근을 액체상태의 배지가 든 삼각플라스크에서 약 45일간 증식속도, 생장량과 뿌리형태를 관찰하며 배양한다.
		많은 산삼 유전자원 Line별로 HPLC를 이용하여 분석한 후 산삼사포닌 고함유 뿌리를 선발한다
4. 자동화 센서를 이용한 최적 배양환경 연구 및 소형 생물반응기 배양		산삼사포닌 고함유 뿌리를 20L 규모 생물반응기에 배양한다.
		이 때 각종 자동화 센서를 이용하여 생장의 최적조건(물리적 조건 : 온도, pH, 공기압 등, 화학적 조건 : 액체 배지의 조성)을 구명한다
산업적 규모의 산삼배양근 대량생산		
5. 배양액 제조		필터를 통과해 정제된 물을 10ton 규모의 ① 탱크에 저장 후 ②배지조제 탱크로 이송한 뒤 식물생장에 필요한 각종 영양물질을 넣어 잘 섞어 ③배지 멸균탱크로 이송한다.
		배지멸균 탱크에서는 스팀을 이용하여 이송된 배양액을 멸균한다.
		멸균된 배양액을 ④배지 저장고에 보관한 후 필요시 배양탱크로 이송하여 뿌리 배양에 사용한다.

산업적 규모의 산삼배양근 대량생산		
6. 접 종		무균적으로 자란 종자용 산삼 배양근을 ⑦종자조제용 탱크로(750L) 이송, 장착된 칼날로 자른 후 접종탱크로 이송한다.
		접종탱크에서 10일이상 오염상태를 확인한 뒤 배양탱크로 접종한다.
7. 산업형 생물반응기 배양		20ton 규모의 배양탱크에 접종된 뿌리에서 새 뿌리가 형성되도록 배양액과 소독된 공기를 공급하여 일정기간 배양한다.
		모든 과정은 통제실의 스위치 조작으로 자동 제어된다.
8. 수확 및 수세		생물반응기 내에서 약 60일간 자란 산삼배양근을 수확한 후 '먹는 물 관리법'에 의해 사용 적합한 물을 이용하여 수차례 수세한다.
	