

식물세포의 관류배양을 위한 초음파 분리기의 개발

구영환, 조규현*

강원대학교 화학공학과

전화) 033) 250-6335 FAX 033) 251-6335

Abstract

In this study, we have developed an ultrasonic separation system for plant cells and its operating conditions in terms of voltage, flow rate and concentration were examined. For plant cell, the operation of ultrasonic separator highly depended on concentration of cells. Holding capacity highly depended on flow rate in chamber. Optimum voltage was 30V in high density culture

서론

식물세포는 동물세포나 미생물에 비하여 성장속도가 느려서 2차 대사물질의 생산성이 낮다. 따라서, 식물세포를 산업적으로 이용하기 위해서는 고농도 배양이 필수적이다. 세포를 고농도로 배양하기 위해서 여러 가지 방법이 시도되었는데, 그중 하나가 관류식 배양기(perfusion system)를 이용한 세포배양이다. 관류식 배양기는 배양기내에 있는 spent medium을 바깥으로 빼내고 fresh medium을 가하여 glucose 및 영양분을 보충하게 된다. spent medium을 밖으로 배출시 세포가 배지와 같이 바깥으로 나가게 된다. 따라서 세포를 고농도로 배양하기 위해서는 배출되는 배지에 들어있는 세포를 분리하여 세포는 다시 배양기 안으로 보내야 한다. 이러한 고-액 분리는 현재까지 원심분리, 막등을 이용하여 세포와 배지를 분리하였다. 특히 막은 효율 면이나 사용상의 편리함 때문에 많이 이용된다. 그러나 막은 장시간 사용하면 세포에 의하여 공극이 막히는 현상이 발생하여 일정시간이 지나면 막을 교체해 주어야만 했다. 막을 교체 시 교체비용 뿐만 아니라 세포가 오염될 수 있는 위험성을 안고 있다. 이러한 단점을 보완하기 위하여 초음파를 이용하여 세포와 배지를 분리하는 방법이 시도되었다[1]. 진동자에 의해 발생된 초음파는 반사판에 반사되어 정재파를 형성하게 된다. 입자들이 이러한 정재파에 노출되게 되면 입자의 매질과의 밀도차에 따라 정재파의 velocity anti-node 또는 velocity node로 이동하여 초음파 파장의 1/2의 간격으로 응집된다[2]. Acoustic field에서 응집된 입자들은 일정크기로 성장한 뒤, 중력에 의해 침강하고 매질은 acoustic field 밖으로 배출됨으로써 고-액분리가 일어나게 된다.

본 연구는 식물세포의 고농도배양을 위한 perfusion system에 사용할 초음파분리기의 제작 및 운전조건에 따른 분리효율의 변화에 대하여 조사하였다.

재료 및 방법

1) 실험장치 및 시약

i) 세포주 및 배양조건

실험에 사용한 세포는 *Aloe saponaria Haw*를 현탁 배양한 세포를 사용하였다. 배지는 M&S 기본배지에 glucose 3%(w/v), NAA 30 μ M, BA 10 μ M를 첨가한 배지를 사용하였으며 배양조건은 실내온도가 25 $^{\circ}$ C 인 암실에서 배양하였다.

ii) 실험장치

초음파 고-액 분리기는 ultrasonic generator 와 resonator 로 구성된다. Ultrasonic generator는 2~3MHz의 주파수를 발생하여 최대 48V까지 전압을 올릴수가 있다. Ultrasonic resonator는 진동자, 반사판, 이들을 고정시키고 고-액분리가 일어나는 chamber로 구성된다, 진동자는 piezoceramic transducer(Tokin $\phi=5\text{cm}$)를 사용하였고 반사판은 평면유리를 사용하였다.

2) 분리효율 측정

세포의 농도는 세포의 DCW(Dry Cell Weight)를 측정하여 구하였다. 시료의 채취는 40ml씩 하였으며 분리효율은 (1)식에 의하여 구하였다.

$$SE = \left(1 - \frac{C_{out}}{C_{in}}\right) \times 100 \quad (\%) \quad (1)$$

여기서, C_{out} 은 chamber에서 배출되는 입자의 농도[g/l]이고, C_{in} 은 reservoir에서 chamber로 들어가는 입자의 농도 [g/l]이다.

결과

식물세포에 대한 초음파 분리의 분리효율은 먼저 식물세포의 농도에 대하여 시행하였다. 식물세포의 농도는 저농도(4g/LDCW)와 고농도(8g/LDCW)로 나누어 측정하였다. 저농도에서는 분리기내에서 응집된 세포가 아래로 침강하여 정상상태에 이르렀다. 저농도에서 초음파를 가하였을 때와 가하지 않았을 때를 비교하면 유속이 2 L/hr에서 초음파를 가하였을 때 분리효율이 10% 향상되었다. 고농도에서는 유속의 범위가 0.13~0.524 L/hr에서 응집된 세포가 아래로 침강하지 않고 chamber안에 쌓여 시간의 차이는 있지만 모두 밖으로 배출되었다(그림2). 따라서 고농도에서는 중력에 의한 침강이 불가능하므로 역압(back-pressure)을 가해 입자를 강제로 침강시키는 전략(Back-pressure mode)을 세웠다. 이러한 운전전략을 세우기 위해서는 역압을 가하는 주기를 아는 것이 중요하며 이를 알기 위해서는 응집된 세포가 밖으로 배출되기까지의 시간인 holding time을 측정하여야 한다.

유속이 holding time에 미치는 영향은 그림 3에서 보이듯이 유속이 증가할수록 holding time이 증가하였다. 또한 전압이 30V에서 holding time이 32분으로 최대치를 보이며 따라서 초음파분리에는 최적의 전압이 존재함을 알 수 있다.

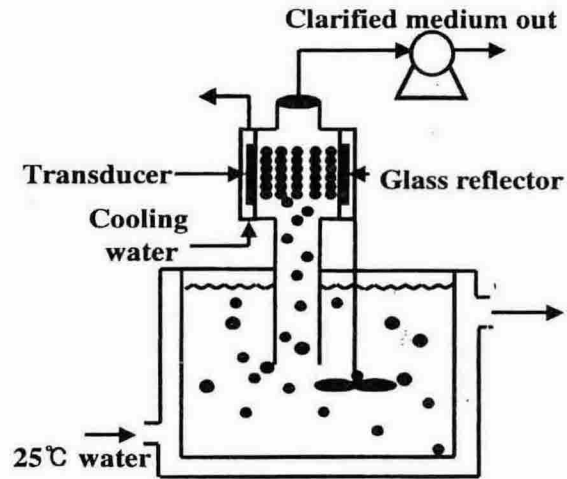


Figure 1. Schematic representation of ultrasonic system

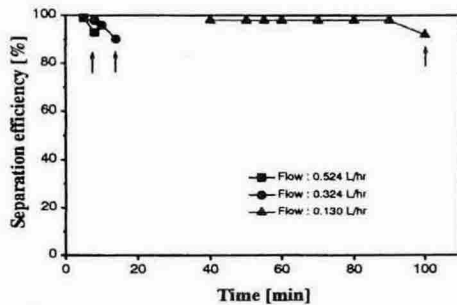


Figure 2. Time dependent curves of separation efficiency at cell concentration of 8gDCW/L.

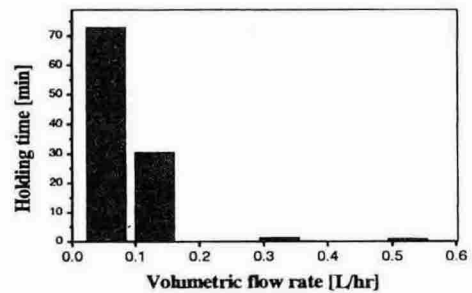


Figure 3. Influence of volumetric flow rates on holding time.

Cell concentration : 17gDCW/L, voltage 30V

참고문헌

1. Felix Templer, Stefan A. Sonderhoff, Phylis W. S. Pui, Douglas G. Kilburn, and James M. Piret, "Acoustic cell filter for high density perfusion culture of hybridoma cell", *Biotechnology*, 12, p281~284 (1994)
2. Martin Groschl, "Ultrasonic separation of suspension particles-part I: fundamentals", *Acoustica*, 84, p432~447, (1998)