

Flavonoid 배당체 생산을 위한 *Scutellaria baicalensis* G. 식물 세포 배양에서 생물반응기 운전전략

†최 정 우 · 조 진 만 · 이 정 건 · 이 원 홍 · ¹김 익 환 · ²박 영 훈

서강대학교 공과대학 화학공학과, ¹고려대학교 생명공학원, ²한국과학기술원 생명 공학 연구소 생물 자원 공정 연구부
(접수 : 1997. 12. 12., 게재승인 : 1998. 4. 10.)

Bioreactor Operating Strategy in *Scutellaria baicalensis* G. Plant Cell Culture for the Production of Flavone Glycosides

†Jeong-Woo Choi, Jin Man Cho, Jeong-Gun Lee, Won-Hong Lee, Ik Hwan Kim¹ and Young Hoon Park²

Department of Chemical Engineering, Sogang University, Seoul 121-742, Korea

¹Graduate School of Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea

²Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology P.O. Box 115, Taejeon, Korea

(Received : 1998. 12. 12., Accepted : 1998. 4. 10.)

Optimal feeding strategies in bioreactor operation of *Scutellaria baicalensis* G. plant cell culture were investigated to maximize the production of flavone glycosides by using a structured kinetic model which can predict culture growth and flavone glycosides synthesis in a rigorous, quantitative manner. For the production of baicalin and wogonin-7-O-GA, the strategies for glucose feeding into *Scutellaria baicalensis* G. plant cell culture were proposed based on the model, which are a periodic fed-batch operation with maintenance of cell viability and of specific production rate respectively, and a perfusion operation with maintenance of specific production rate for baicalin and wogonin-7-O-GA. Simulation results showed that the highest volumetric concentration of flavone glycosides was obtained in a periodic fed-batch operation with maintenance of cell viability among all the suggested strategies. In the periodic fed-batch operations, the higher volumetric production of flavone glycosides was achieved compared with that in the perfusion operation. It can be concluded that a periodic fed-batch operation with maintenance of cell viability would be the optimal and practical operating strategy of *Scutellaria baicalensis* G. plant cell culture for the production of flavone glycosides.

Key words : *Scutellaria baicalensis* G, plant cell, feeding strategy, periodic fed-batch, perfusion

서 론

최근에 식물 세포의 대규모 배양에 관한 연구가 활발히 진행되어 왔으나 낮은 생산성 및 느린 성장 속도, 배양의 불안정성, 대량생산을 위한 scale-up의 어려움 등으로 상업화 실적은 미미한 형편이다(1). 현재까지 일본의 Tobacco company에 의해 *Nicotiana tabacum*의 대규모 배양(20kL)에 성공하였고, plant pigment인 Shikonin과 antibiotics인 Berberine의 상업적 생산이 이루어져 식물 세포 배양의 상업화 가능성을 제시하고 있다(1-3). 보다 폭넓은 식물 세포 배양 공정의 상용화를 위해서는 생물 공정 공학적인 측면에서 생산성을 향상시키기 위한 식물 세포 배양기 수준에서의 모델링과 이를 이용한 효과적인 운전

전략을 구성하고 실제 배양기 운전시에 적용하여 배양 공정을 최적화 하기 위한 연구가 필요하다.

식물 세포 현탁 배양에 있어서 특징은 미생물 세포와 비교해 볼 때 느린 세포 성장과 기질의 소모이다(4-6). 앞서 수행된 *Scutellaria baicalensis* G. 세포의 현탁 배양 실험 결과에서도 이러한 식물 세포의 느린 성장과 기질 소모를 관찰할 수 있다(7-9). 그러므로 유가식 배양 공정에서 연속적인 기질의 공급 전략은 세포의 느린 성장과 기질 소모 그리고 세포의 응집체 형성을 유발하기 때문에 적합하지 않다(10). 또한 연속적인 기질의 공급은 배양 부피를 크게 하고 소모되지 않는 기질이 잔존하게 되므로 적합하지 않다. 연속적인 기질 공급 전략의 단점을 극복하기 위하여 유가식 배양에서 주기적인 기질 공급과 배양 기간 중 배양액의 일부를 새로운 배양액으로 대체하는 perfusion 운전 등의 반 연속식 기질 공급 전략이 제안되고 있다(10).

대부분의 식물 세포 배양 공정에서 이차 대사 산물의 생성은 전이 상태에서 이루어지므로 반 연속식 기질 공급 전략은 효율적인 공정의 운전 전략이라 할 수 있다. 이러한 반 연속식 기질

† Corresponding author : Department of Chemical Engineering, Sogang University Sinsu-Dong, Mapo-Gu, Seoul 121-742
Tel : 02-705-8480, Fax : 02-711-0439
e-mail : jwchoi@ccs.sogang.ac.kr

공급 전략에서 중요한 변수로는 기질 공급의 간격과 이차 대사 산물 생성을 최대화하기 위하여 유지되는 세포 생리학적 매개변수들이다. 이차 대사 산물의 생산을 최대화하기 위해 유지되는 세포 생리학적 매개변수의 결정은 앞서 제안된 세포 성장과 이차 대사 산물 생산에 관한 구조적 성장 모델식과 회분식 현탁 배양 실험 결과에 의해 이루어질 수 있다. 앞선 회분식 배양 실험 결과와 수립된 모델의 예측은 세포 활동도와 생존도가 세포 성장의 각 상에 따라 변화하고 생성물 생성에 관련되어 있음을 보여준다. 이러한 결과로부터 생성물의 생성이 분화 가능한 생존 세포와 비분화 생존 세포에 의해 형성됨을 설명하고 있다. 따라서 기질의 공급에 의해 유지되는 매개변수로서 세포의 생존도와 단위 세포당 생성물의 생성률을 선택하였다.

본 논문에서는 앞선 연구 과제에서 본 연구진에 의해 수립된 *Scutellaria baicalensis* G. 세포의 성장 및 이차 대사 산물의 생산을 정확히 예측할 수 있는 구조적 식물 세포 성장 모델식을 이용하여 기질공급을 현상모사하여 이차 대사 물질 생산의 최대화를 위한 운전 전략을 제시한다. 수립된 운전 전략으로서 세포 생존도를 유지시키는 주기적 유가식 운전과 주요 생성물인 baicalin과 wogonin-7-0-GA 각각에 대한 비 생산성을 유지시키는 주기적 유가식 운전 및 perfusion 운전을 제시한다. 제시된 운전 전략을 실제 배양기에 적용하기에 앞서 *Scutellaria baicalensis* G. 세포의 구조적 성장 모델식을 이용하여 현상모사함으로써 효율적인 운전 전략에 대한 비교를 수행하여 가장 최적화된 운전 전략을 찾고자 한다.

재료 및 방법

회분식 현탁 세포 배양 실험

Scutellaria baicalensis G.의 현탁 배양 및 고체 배양은 고려대학교 생명공학원의 김 익환 교수로부터 제공된 것을 본 연구진이 제공받아 사용하였다. 현탁 세포 배양과 고체 배양을 위하여 Schenk와 Hildebrandt 배지에 2mg/L의 2,4-D와 1mg/L의 kinetin을 첨가한 PSH(Pytohormone added Schenk and Hildebrandt) 배지 및 flavonoid 배당체 생산량 증대를 위해 개조된 FPM(Flavonoid Production Medium) 배지를 사용하였다(7). 멸균된 pH를 5.8로 조정된 배양액 50mL를 125mL Erlenmeyer flask에 분주하여 현탁배양을 수행한다. 배양의 초기 접종량은 배양액 50mL에 대하여 세포 생체 중량으로 1g의 세포를 접종하였으며 매일 2개의 flask를 세포 중량, flavone glycosides 농도 및 세포의 생존도 측정을 위하여 사용한다. 세포현탁배양은 shaking incubator(Vison 과학 model 8480 SR)에서 교반속도 180rpm으로 유지된다. 배양 온도는 25°C이며 암흑 배양하였다.

분석방법

세포의 성장 상태를 나타내는 세포 중량은 건조 중량과 생체 중량으로서 측정한다. 세포 생체 중량은 현탁 세포를 여과한 후 여액과 분리된 세포들만의 무게로서 나타내고 세포 건조 중량은 여과된 세포를 1일간 60°C에서 건조시킨 후 측정된 무게로서 나타낸다. 기질로서 작용하는 여액 내의 glucose 농도 분석은 spectrophotometer(550nm)를 이용한 DNS(Dinitrosalicylic acid) 방법으로 측정한다. flavonoid 배당체의 농도는 Bondapark™

C18 column이 장치된 HPLC를 이용하여 측정하고 이 때의 이동상은 145mL tetrahydrofuran, 125mL dioxan, 50mL MeOH, 20mL AcOH, 2mL 5% H₃PO₄, 658mL deionized water으로 이루어지며 유속은 0.8mL/min이며, UV detector의 파장대는 270nm이다.

이론

Scutellaria baicalensis G. 식물 세포 성장 모델식

세포의 성장과 flavonoid 배당체 생산 관계를 모델화하기 위하여 다음과 같이 가정한다. 생존 능력에 기초하여 세포를 생존 세포와 죽은 세포로 나누고 생존도(viability)는 전체 세포 건조 중량에 대한 생존 세포 건조 중량의 비로 정의한다. 생존도는 NADH 형광센서의 실험 결과를 해석하여 결정된다(11). 생존 세포는 다시 분화 능력에 기초하여 분화 가능한 생존 세포와 분화가 가능하지 않은 생존 세포로 나누어진다. 활동도(activity)는 생존 세포 건조 중량에 대한 분화 가능한 생존 세포의 건조 중량의 비로 정의된다. 분화 가능한 생존 세포는 분화 가능한 생존 세포로 분열하거나 분화 가능하지 않은 생존 세포로 되어 결국엔 생존도를 잃게 된다. 아래의 모델식에서 분화 가능한 생존 세포의 건조 중량은 X_{ad} , 분화가 가능하지 않은 생존 세포의 건조 중량은 X_{nd} , 전체 생존 세포의 건조 중량은 X_{vd} , 비생존 세포의 건조 중량은 X_{dd} , 전체 세포의 건조 중량은 X_d 로 각각 표현된다. 또한 기질의 농도는 S_G , apigenin의 농도는 a , baicalin의 농도는 b , wogonin-7-0-GA 농도는 w , 그리고 세포의 생체 중량은 X_f 로 표현하였다.

Scutellaria baicalensis G. 식물 세포 배양 공정의 구조적 성장 모델 수립 연구에서 제안된 모델식은 다음과 같으며(9) 이를 토대로 운전 전략의 구성 및 구성된 운전 전략이 적용된 배양 공정의 현상 모사를 수행하였다.

세포 생존도

$$V = \frac{X_{vd}}{X_d} \quad (1)$$

세포 활동도

$$A = \frac{X_{ad}}{X_{vd}} \quad (2)$$

분화 가능한 생존 세포 건조 중량식

$$\frac{dX_{ad}}{dt} = (1 - \exp(-\frac{t}{t_L})) \quad (3)$$

$$\frac{\mu_{mG} S_G}{K_G + S_G} X_{ad} - k\phi X_{va}$$

비분화 생존 세포의 건조 중량식

$$\frac{dX_{nd}}{dt} = k\phi X_{va} - k_d \frac{X_f}{V} \quad (4)$$

생존 세포의 건조 중량식

$$\frac{dX_{vd}}{dt} = (1 - \exp(-\frac{t}{t_L})) \frac{\mu_{mG}S_G}{K_G + S_G} X_{ad} - k_d \frac{X_f}{V} \quad (5)$$

비생존 세포의 건조 중량식

$$\frac{dX_{dd}}{dt} = k_d \frac{X_f}{V} - k_L X_{da} \quad (6)$$

전체 세포의 건조 중량식

$$\frac{dX_d}{dt} = (1 - \exp(-\frac{t}{t_L})) \frac{\mu_{mG}S_G}{K_G + S_G} X_{ad} - k_L X_{da} \quad (7)$$

활동도식

$$\frac{dA}{dt} = (1 - \exp(-\frac{t}{t_L})) \frac{\mu_{max} S_G}{K_G + S_G} (1 - A)A - k\phi + k_d \frac{AX_f}{V^2 X_d} \quad (8)$$

생존도식

$$\frac{dV}{dt} = (1 - \exp(-\frac{t}{t_L})) \frac{\mu_{max} S_G}{K_G + S_G} (1 - V)AV - k_d \frac{X_f}{V X_d} + k_L (1 - V)V \quad (9)$$

상대 형광 세기와 생존도 관계식

$$V = \frac{\frac{FI/FI_m}{X_d}}{[\frac{FI/FI_m}{X_d}]^0} \quad (10)$$

기질의 소모속도식

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/S_c}} (1 - \exp(-\frac{t}{t_L})) \frac{\mu_{mG}S_G}{K_G + S_G} X_{ad} \frac{-1}{Y_{A/S_c}} (\alpha X_{ad} + \beta X_{nd}) \quad (11)$$

생성물식

$$\frac{da}{dt} = \alpha X_{ad} + \beta X_{nd} - Y_{a/b} k_3 \frac{a}{k_{3b} + a} X_{vd} - Y_{a/w} k_4 \frac{a}{k_{4w} + a} X_{vd} \quad (12)$$

$$\frac{db}{dt} = k_3 \frac{a}{k_{3b} + a} X_{vd} - \lambda_3 X_{da} \quad (13)$$

$$\frac{dw}{dt} = k_4 \frac{a}{k_{4w} + a} X_{vd} - \lambda_4 X_{da} \quad (14)$$

세포의 생체 중량식

$$\frac{dX_f}{dt} = (1 - \exp(-\frac{t}{t_L})) k_1 X_{ad} - k_2 k_L X_{dd} - \theta(S_G) X_d \quad (15)$$

매개변수 추정

수립된 모델 식들은 미분식으로서, 모델에 사용된 매개변수들은 비선형 매개변수 추정 기법을 이용하여 얻어진다(12, 13). 매개변수의 추정이 이루어지는 동안 Runge-Kutta-Verner sixth-order 방법을 이용하여 미분식의 수치적분으로 동시에 해를 구하게 되며, 실험 결과와 모델식의 결과가 가장 잘 일치하는 것으로 매개변수는 결정된다(14). 회분식 세포배양 실험결과와 모델식의 결과는 잘 일치하는 것으로 판명되었으며, 비교결과 및 매개변수값은 참고문헌 9에 나타내었다.

운전 전략의 수립

식물 세포 현탁 배양에 있어서의 전형적인 특성은 미생물 세포와 비교해 볼 때 느린 세포 성장과 기질의 소모이다. 본 연구에서 사용한 세포주인 *Scutellaria baicalensis* G. 식물 세포의 현탁 배양에서도 느린 성장과 기질의 소모를 볼 수 있다(7-9). 따라서 연속적인 기질의 공급은 식물 세포의 느린 성장과 기질의 소모 그리고 세포 응집체의 형성 등으로 인하여 적합한 공정 운전 전략이라고 볼 수 없다. 이러한 연속적인 기질 공급 운전 전략의 난점을 극복하기 위한 효과적인 방법으로서는 반연속적인 운전 전략이 연구되고 있으며(11), 본 연구에서는 기질의 주기적인 공급 방식과 소모된 기질을 새로운 기질과 교환하는 반연속식 운전 전략을 수립하였다. 이러한 반연속식 운전 전략에 있어서 가장 중요한 변수는 기질의 공급 간격과 매개변수의 유지이다. 매개변수는 생성물의 생산을 극대화하기 위해 선택된 것으로서 구조적 모델과 실험 결과를 토대로 결정된다. 회분식 배양 실험 결과와 모델의 예측 결과로부터 세포 성장의 각 단계에서 세포 생존도 및 세포 활동도의 변화는 생성물의 생산과 관련됨을 보여준다. 이러한 현상은 생성물의 생산이 분화가능한 생존 세포와 분화하지 않는 생존 세포에 의해 형성됨을 설명하고 있다. 본 연구에서 기질의 공급에 의해 유지되는 매개변수들로는 세포의 생존도와 단위 세포당 생성물의 생성 속도를 선택하였다. 기질 공급 형태 즉 운전 전략을 크게 주기적 유가식 운전과 perfusion 운전으로 나누어 수행하였으며 현상 모사 결과를 비교하여 *Scutellaria baicalensis* G. 식물 세포 배양 공정의 최적화된 운전 전략을 찾고자 하였다. 주기적 유가식 운전의 현상 모사 조건은 다음과 같다. 초기 기질의 농도를 회분식 배양에서와 같은 30g/L 로하고 1회에 공급되는 기질의 부피를 200mL, 농도는 30g/200mL로 하였다. 전체 배양의 초기 부피는 1L이며 최종 부피는 3회의 공급 결과로 1.6L이다. Perfusion 운전 시의 현상 모

사 조건은 전체 배양 부피가 1L로 유지되고 총 4회에 걸쳐 생산 물질의 비생산 속도가 감소하는 시점에서 소모된 기질의 1/2을 새로운 기질로 대체한다. Fed-batch 배양에서의 5가지 운전 전략에 대한 운전 전략의 현상 모사는 수립된 구조적 성장 모델식에 근거하여 Hamming's Modified Predictor Collector 기법을 사용하여 이루어진다(14). 현상 모사 결과는 세포 건조 중량과 baicalin 및 wogonin-7-0-GA의 생성량 그리고 기질의 소모와 세포 생존도, 활동도의 시간에 따른 변화를 나타낸다. 세포 건조 중량의 최대치와 단위 배양 부피당 baicalin, wogonin-7-0-GA의 농도, 세포 건조 중량당 baicalin, wogonin-7-0-GA의 생성도 등은 현상 모사 결과로부터 계산되며, 모사결과로부터 기질 첨가점이 결정된다.

결과 및 고찰

세포 생존도를 유지시키는 주기적 유가식 운전 전략의 현상 모사

이차 대사 산물인 baicalin과 wogonin-7-0-GA는 생존 세포에 의해 생성되어지므로 세포의 생존도가 유지된다면 baicalin과 wogonin-7-0-GA의 생성도 유지시킬 수가 있다. 세포 생존도 유지를 위한 주기적인 기질 공급 전략에 대한 현상 모사 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 현상 모사 결과 세포 건조 중량의 최대치는 배양 14일 경에 25.86g/L에 도달하였으며, 생성

된 baicalin과 wogonin-7-0-GA의 양을 단위 농도로 표현하였을 때 배양 16일 경에 각각 5.03g/L와 1.99g/L로 나타났다. 한편 세포 활동도는 14일 경에 0으로 떨어지지만 세포 생존도는 유지되어 세포의 성장이 감소하는 배양 말기까지 baicalin과 wogonin-7-0-GA을 생산할 수 있게 된다. 이러한 현상 모사 결과는 회분식 배양 결과에 비해 향상된 결과로서 flavonoid 배당체 총 생산량 측면에서 볼 때 단위 세포당 flavonoid 배당체의 생산 속도를 유지하는 주기적 유가식 운전 전략보다는 60% 가량 향상된 결과이고, perfusion 운전 전략보다는 120% 정도 높게 나타난 것이다. 세포 생존도를 유지시키는 주기적 유가식 운전 전략은 다른 운전 전략에 비해 배양내 세포 농도가 낮기 때문에 기질의 공급이나 교반시 발생하는 문제점이 적어 고려된 운전 전략 가운데서 가장 최적화된 운전 전략임을 나타내었다.

Baicalin과 wogonin-7-0-GA의 비생산 속도를 유지시키는 주기적 유가식 운전 전략의 현상 모사

세포 단위 질량 당 flavonoid 배당체의 생성 속도가 기질의 공급에 의해 직접 제어되므로 가장 유용한 방법으로 예상되는 운전 전략이었으나 현상 모사 결과 목적 생산물질의 생성이 세포 생존도를 유지시키는 주기적 유가식 운전 전략에 비해 낮음을 알 수 있다. Fig. 2는 baicalin의 비생산 속도를 유지시키는 주기적 유가식 운전 전략의 현상 모사 결과를 나타낸다. 결과에서 보듯이

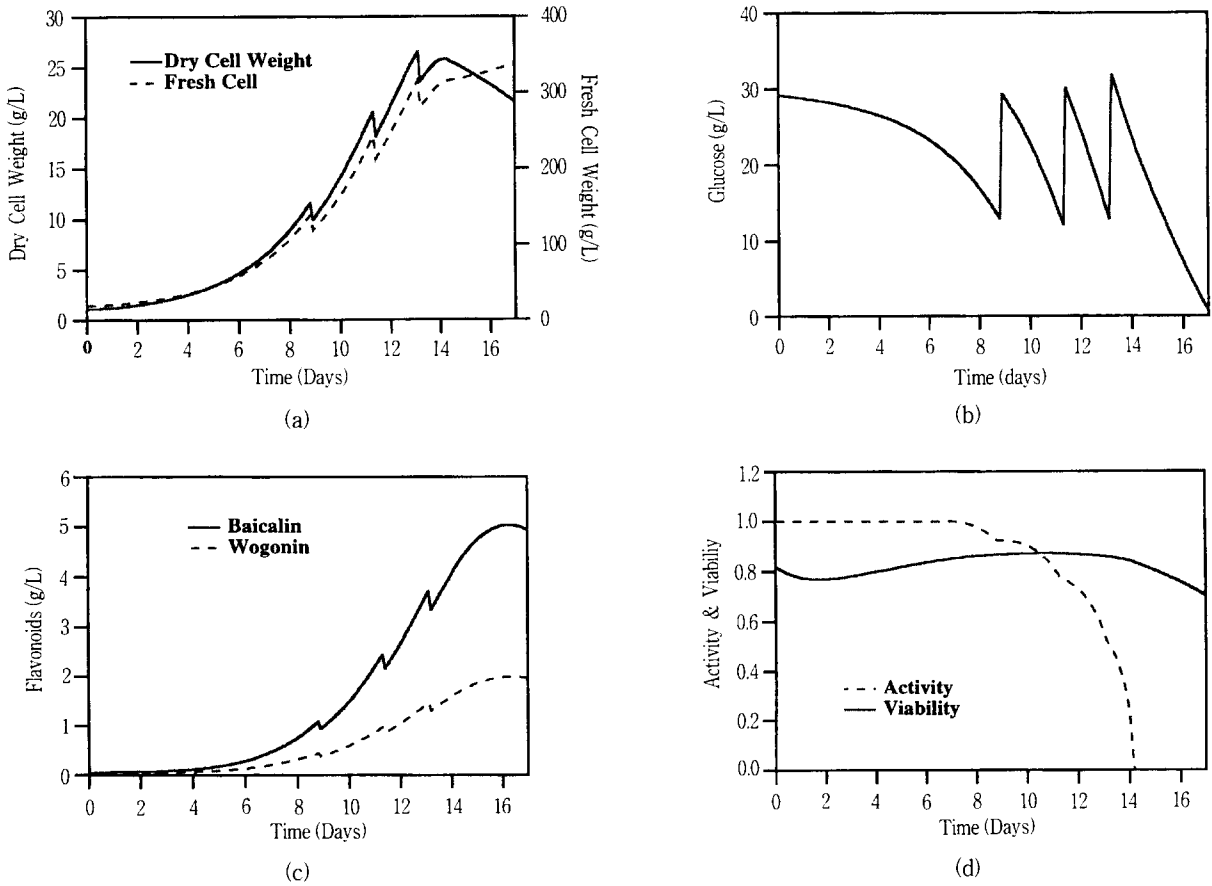


Figure 1. Simulation results of periodic fed-batch operation for cell viability maintenance (a) dry cell weight and fresh cell weight, (b) glucose concentration, (c) baicalin and wogonin-7-0-GA concentration, and (d) activity and viability.

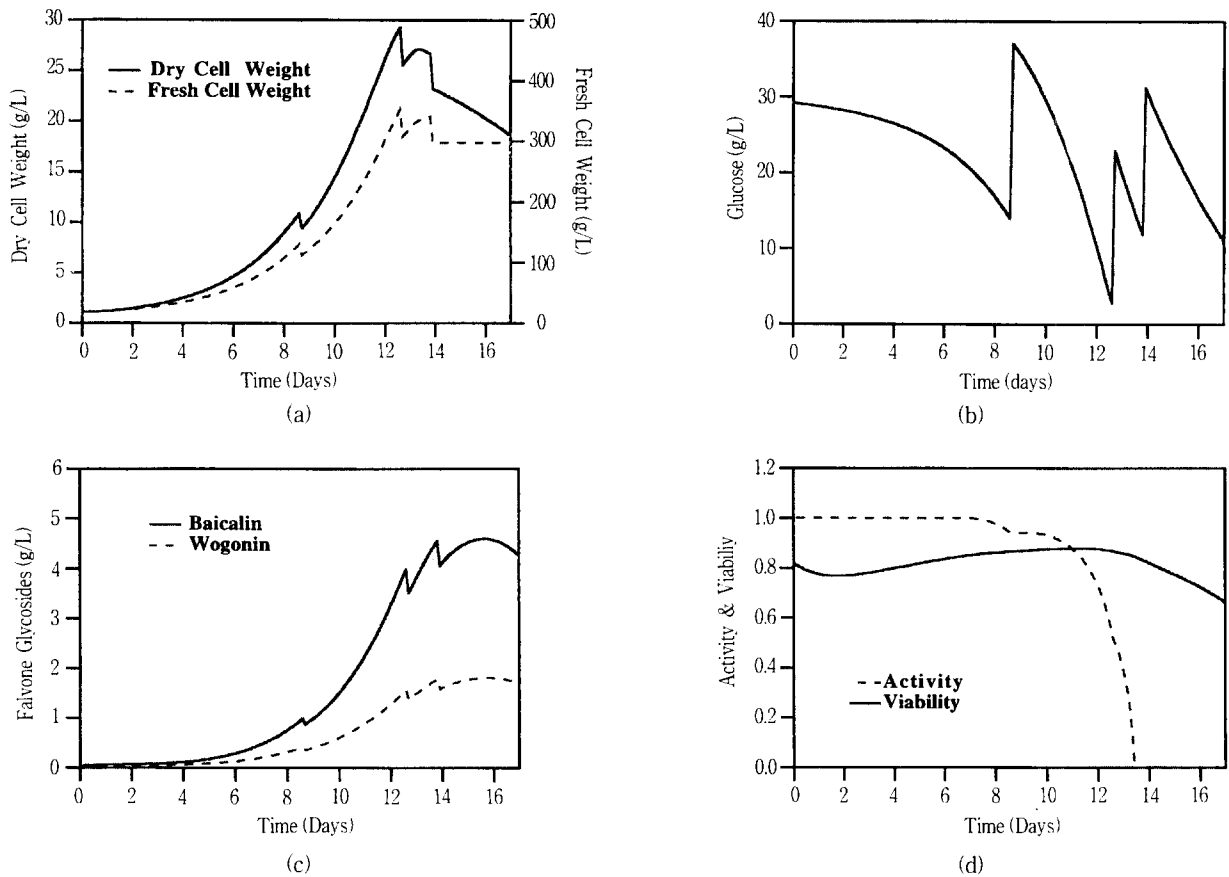


Figure 2. Simulation results of periodic fed-batch operation for specific baicalin production rate maintenance (a) dry cell weight and fresh cell weight, (b) glucose concentration (c) baicalin and wogonin-7-O-GA concentration, and (d) activity and viability.

세포 건조 중량은 배양 11일 경에 최대치 29.31g/L에 도달하였으며 baicalin과 wogonin-7-O-GA의 생성량은 단위 부피당 각각 4.59g/L와 1.81g/L로 나타났다. Fig. 3은 wogonin-7-O-GA의 비생산 속도를 유지시키는 주기적 유가식 운전 전략의 현상 모사 결과이다. 이 때의 최대 세포 건조 중량은 29.58g/L이고 생산된 baicalin과 wogonin-7-O-GA의 농도는 각각 4.64g/L와 1.83g/L로 나타났다. Baicalin과 wogonin-7-O-GA의 비생산 속도를 유지시키기 위한 주기적 유가식 운전 전략은 현상 모사 결과에서 보여지듯이 서로 비슷한 결과를 보이니 앞선 세포 생존도 유지를 위한 주기적 유가식 운전 전략에 비해 낮은 flavonoid 배당체 생산성을 나타내고 있으며 세포의 성장이 많이 이루어져 배양의 교반과 기질의 전달에 문제점을 안고 있는 공정이라 할 수 있다.

Baicalin과 wogonin-7-O-GA의 비생산 속도를 유지시키는 perfusion 운전 전략의 현상 모사

앞서 언급한 운전 전략들은 유가식 운전으로 기질을 첨가하여 공급하는 형태였으나 perfusion 운전의 개념은 소모된 기질과 새로운 기질을 교환한다는 의미이다. 즉 단위 세포당 flavonoid 배당체의 비생산 속도가 처음으로 감소하는 시점에서 배양내 기질의 반을 제거하고 같은 부피의 새로운 기질을 공급하여 주는 조작이다. Fig. 4는 baicalin의 비생산 속도를 유지하기 위한 perfusion 운전 전략의 현상 모사 결과를 나타

낸다. 세포 건조 중량은 배양 12일 경에 25.27g/L에 도달하였으며 baicalin과 wogonin-7-O-GA의 생산량은 배양 14일 경에 각각 4.41g/L과 1.75g/L로 나타났다. Fig. 5는 wogonin-7-O-GA의 비생산 속도를 유지하기 위한 perfusion 운전 전략의 현상 모사 결과로서 최대 세포 건조 중량은 배양 12일 경에 25.46g/L로 나타났으며 baicalin과 wogonin-7-O-GA의 생산량은 배양 14일 경에 각각 4.46g/L와 1.77g/L로 나타났다. 이 현상 모사 결과는 앞선 주기적 유가식 운전전에 비해 낮은 수치이며 이러한 결과는 perfusion 운전의 특성에 기인한 dilution 효과 때문이다. 따라서 perfusion 운전은 주기적 유가식 운전에 비해 *Scutellaria baicalensis* G. 식물 세포 배양 공정에 적합하지 않은 운전 전략이라 할 수 있다.

Flavonoid 배당체 생산과 세포 성장에 따른 현상모사의 결과는 Table 1에 나타내었다. 제시된 운전전략들을 비교한 결과 생성물의 수득률 측면에서 세포 생존도 유지를 위한 주기적 유가식 운전 전략이 가장 효과적인 운전 전략으로 제시되었다. 생성물의 총 생산량은 단위 세포당 생성물의 비생산 속도를 유지하는 주기적 유가식 운전 전략의 경우, 세포 생존도를 유지시키는 주기적 유가식 공정의 90% 가량으로 나타났으며, perfusion 운전 전략의 경우는 세포 생존도를 유지시키는 주기적 유가식 운전 전략의 55% 가량으로 제시되었다. 실제 배양 공정 상에서 세포 생존도의 측정은 본 연구진에 의해 개발된 광섬유 형광센서에 의해 측정할 수 있으므로(11) 광섬유 형광센서를 통해서 측

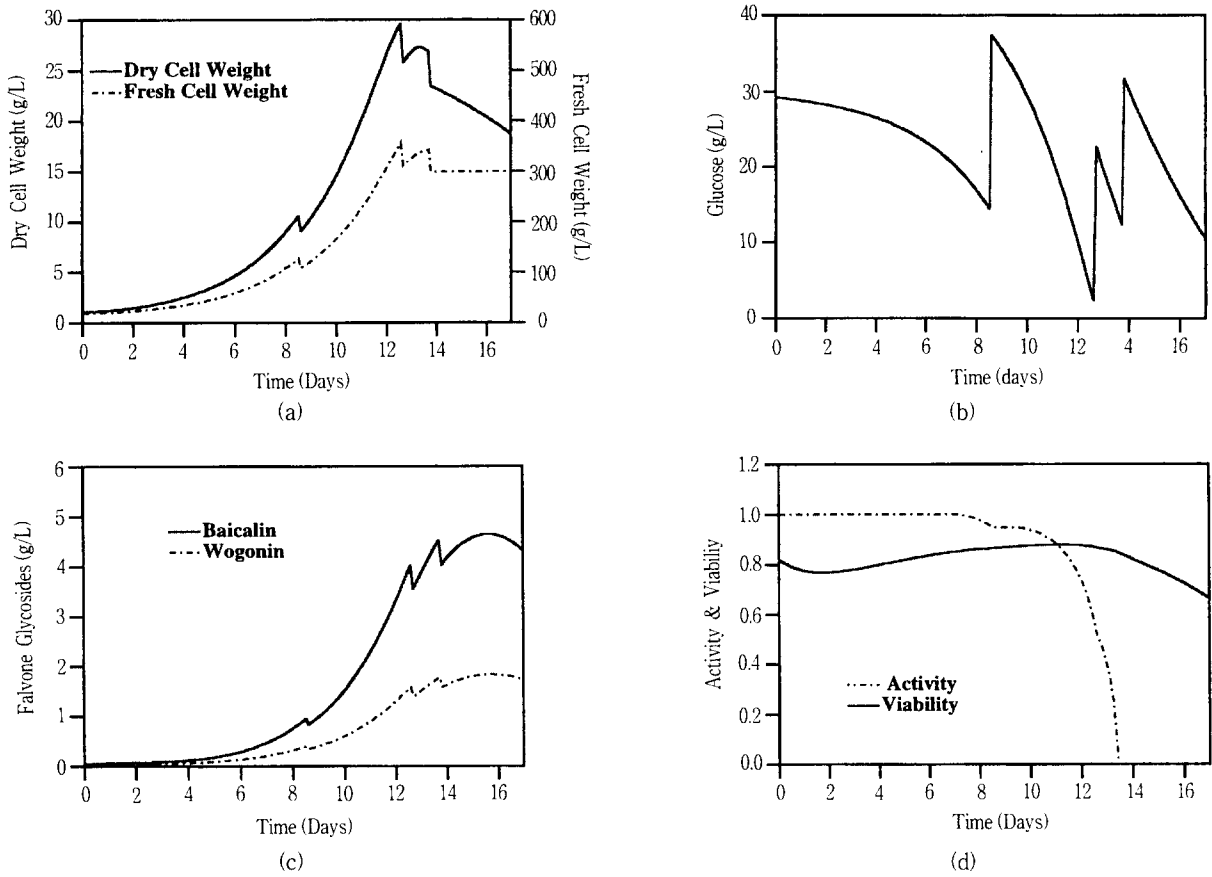


Figure 3. Simulation result of periodic fed-batch operation for specific wogonin-7-0-GA production rate maintenance (a) dry cell weight and fresh cell weight, (b) glucose concentration, (c) baicalin and wogonin-7-0-GA concentration, (d) activity and viability.

Table 1. Simulation results of operating strategies for baicalin and wogonin-7-0-GA production.

	Periodic fed-batch operation			Perfusion operation with maintenance of specific production rate	
	cell viability maintenance	Apecific production rate maintenance			
		baicalin	wogonin-7-0-GA	baicalin	wogonin-7-0-GA
Production culture period (day)	17.0	19.0	19.0	15.0	15.0
Total culture volume (L)	1.60	1.60	1.60	1.00	1.00
Maxium dry cell weight (g/l)	25.86	29.31	290.58	25.27	25.46
product concentration (g/L)	1.99	1.81	1.83	1.75	1.77
Total product amount (g)	3.18	2.90	2.93	1.75	1.77
Consumed glucose amount (g)	120.0	12.0	12.0	75.0	75.0
Specific production yield (g/g DCW)	0.123	0.099	0.099	0.069	0.070
Production yield (g/g glucose)	0.024	0.024	0.024	0.023	0.024

정되어진 생존도를 유지할 수 있는 방향으로 공정 운전 전략을 구성하고 세포의 응집체 형성 문제와 소모되지 않은 기질의 유출 문제를 해결할 수 있는 주기적 유가식 운영을 수행한다면

Scutellaria baicalensis G. 식물 세포 배양을 통한 flavonoid 배당체 생산을 향상시킬 수 있으리라 사료된다.

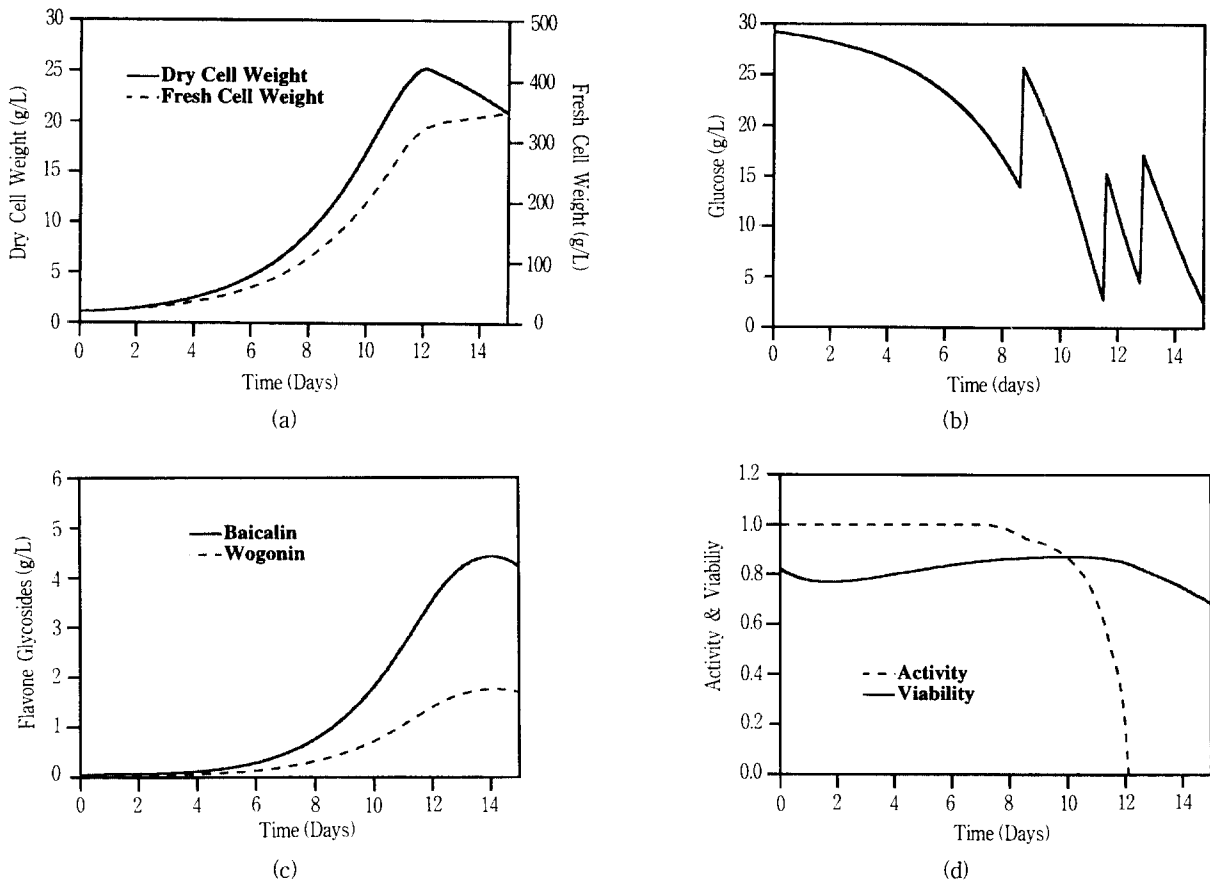


Figure 4. Simulation results of perfusion operation for specific baicalin production rate maintenance (a) dry cell weight and fresh cell weight, (b) glucose concentration, (c) baicalin and wogonin-7-0-GA concentration, and (d) activity and viability.

요 약

Scutellaria baicalensis G. 식물 세포의 세포성장과 flavonoid 배당체 생산을 예측할 수 있는 구조적 성장 모델을 이용하여 배양 공정 운전시 flavonoid 배당체 생산을 향상시킬 수 있는 최적화된 운전 전략을 조사하였다. 세포 생존도를 유지시키기 위한 주기적 유가식 운전, baicalin 비생산 속도 유지를 위한 주기적 유가식 운전, wogonin-7-0-GA 비생산 속도 유지를 위한 주기적 유가식 운전, baicalin 비생산 속도 유지를 위한 perfusion 운전 및 wogonin-7-0-GA 비생산 속도 유지를 위한 perfusion 운전 등의 운전 전략에 대한 현상 모사를 수행하였다. 현상 모사 결과 세포 생존도를 유지시키는 주기적 유가식 운전이 단위 세포당 flavonoid 배당체의 생산량면에서 가장 유용한 전략이었다. 제시된 모든 주기적 유가식 운전들에서 perfusion 운전에서 보다 높은 flavonoid 배당체의 생산을 나타내었다. *Scutellaria baicalensis* G. 식물 세포 배양에 의한 flavonoid 배당체 생산에 있어서 세포 생존도 유지를 위한 주기적 유가식 운전이 최적이며 실제 운전 가능한 운전 전략으로 제시되었다.

사 용 기 호

- A : activity (g/g)
- FI : relative fluorescence intensity

- k : rate constant (1/day)
- K : Monod constant (g/L)
- P : product concentration (g/L)
- S_G : substrate concentration (g/L)
- t : time (day)
- V : viability (g/g)
- X : biomass concentration (g/L)
- Y : yield coefficient (g/g)

Greek symbols

- a : growth-associated production constant ($gg^{-1}day^{-1}$)
- β : nongrowth-associated production constant ($gg^{-1}day^{-1}$)
- κ : cell expansion coefficient (day^{-1})
- μ : specific growth rate (day^{-1})
- λ : product degradation constant ($gg^{-1}day^{-1}$)
- θ : function for cell expansion
- ϕ : function for activity loss

Subscripts

- d : dry or death
- E : extracellular
- G : glucose
- L : lag phase

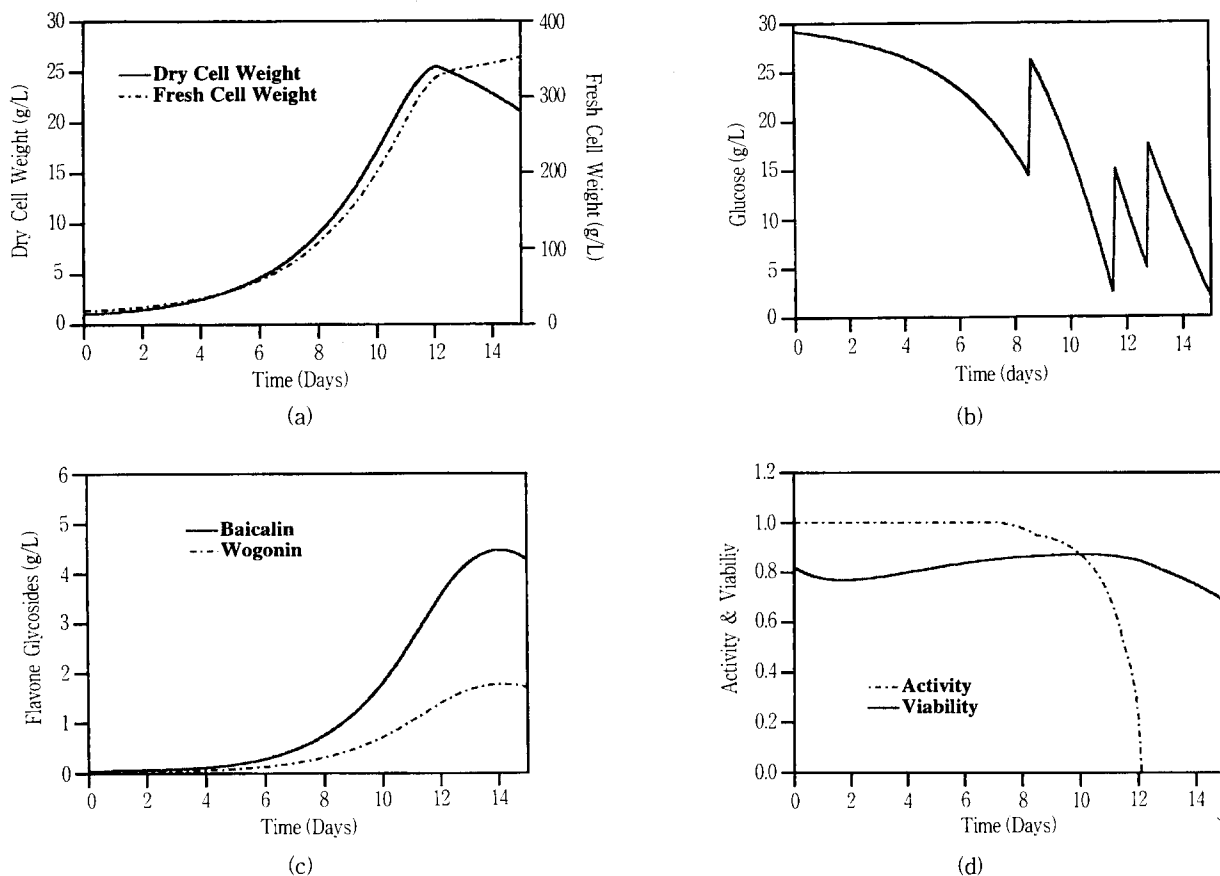


Figure 5. Simulation result of perfusion operation for specific wogonin-7-O-GA production rate maintenance (a) dry cell weight and fresh cell weight, (b) glucose concentration (c) baicalin and wogonin-7-O-GA concentration, and (d) activity and viability.

- m : maximum
- t : total
- ad : active-viable cell
- dd : dead cell
- nd : nonactive-viable cell
- vd : viable cell
- a/S_G : apigenin from glucose
- X/S_G : biomass from glucose
- a/w : apigenin to wogonin-7-O-GA
- a/b : apigenin to baicalin

Superscript

- o : initial

참 고 문 헌

1. Buitelaar M. and J. M. Tramper (1992), Strategies to Improve the Production of Secondary Metabolites with Plant Cell Cultures: A Literature Review, *J. Biotechnol.*, **23**, 111-141.
2. Tanka H. (1987), Large-Scale Cultivation of Plant Cell at High Density : A Review, *Process Biochemistry*, August, 106-113.
3. Fujita. Y. and M. Tabata (1987), Plant Tissue and Cell Culture (C. Green, D.A. Somers, W.P. Hackett, and D.D. Biesboer eds.), pp. 169-185, AlsanT. Liss Inc., New York.
4. Prensil J. and H. Pedersen (1983), Immobilized Plant Cell Reactors, *Enzyme Microb. Technol.*, **5**, 323-331.
5. Panda A. K., S. Mishra, V. S. Bisaria, and S. Bhojwani (1989), Plant Cell Reactors-A Perspective, *Enzyme Microb. Technol.*, **11**, 386-397.
6. Chin C. K., D. I. Kim, and H. Pedersen (1991), Development of Process Strategies for Berberine Production in Plant Cell Suspension Cultures, *J. Biotechnol.*, **21**, 201-208.
7. Seo W. T., Y. H. Park, and T. B. Choe (1993), Identification and Production of Flavonoids in a Cell Suspension Culture of *Scutellaria baicalensis* G., *Plant Cell Rep.*, **12**, 414-417.
8. Lee Y. Y., K. H. You, S. Y. Kim, and B. J. Ahn (1991), Augmentation of the Cytotoxic Effects of Anticancer Drugs by (\pm)-or-Tumerone and Extracts of the *Lithosperma* and *Scutellaria* Roots against Leukemia Cell Lines, *약학회지*, **35**, 203-215.
9. 최정우, 조진만, 이정건, 이원홍, 김익환, 박영훈 (1997), *Scutellaria baicalensis* G., 식물세포의 구조적 모델식, 생물공학 회지 제출증.
10. Westage P. J., W. R. Curtis, A. H. Emery, P. M. Hasewaga

- and P. F. Heinlein (1991), Approximation of Continuous Growth of *Cephalotaxus harringtonia* Plant Cell Cultures Using Fed-Batch Operation, *Biotechnol. Bioeng.*, **38**, 241-248.
11. Choi J. W., J. H. Park, S. C. Lee, D. I. Kim and W. H. Lee (1995), Analysis of Culture Fluorescence by a Fiber-Optic sensor in *Nicotiana tabacum* Plant Cell Culture, *Korean J. of Chem. Eng.*, **12**, 528-534.
 12. Seinfeld J. and L. Lapidus (1970), Process Modeling, Estimation and Identification, pp. 383, Prentice-Hall, New Jersey.
 13. Metzler C. M., G. L. Elfring, and A. J. McEwen (1974), A Package of Computer Programs for Pharmacokinetic Modeling, *Biometrics*, **30**, 562-563.
 14. IBM Co. Technical Publications Department (1970), System /360 Scientific Subroutine Package Programmer's Manual, 5th ed., p 337-343., IBM Co. Tech. Pub. Dep., New York.