한국생물공학회지 제 13권 제 3호
Korean J. Biotechnol. Bioeng.
Vol. 13, No. 3, 251-258(1998)

Scutellaria baicalensis G. 식물 세포의 구조적 성장 모델

†최 정 우 · 조 진 만 · 이 정 건 · 이 원 홍 · [1]김 익 환 · [2]박 영 훈
서강대학교 공과대학 화학공학과, [1]고려대학교 생명공학원, [2]한국과학기술원 생명공학연구소 생물자원공정연구부
(접수 : 1997. 12. 12., 게재승인 : 1998. 4. 10.)

A Structured Growth Model of *Scutellaria baicalensis G.* Plant Cell

†Jeong-Woo Choi, Jin Man Cho, Jeong-Gun Lee, Won-Hong Lee, Ik Hwan Kim[1], and Young Hoon Park[2]
Department of Chemical Engineering, Sogang University, Seoul 121-742, Korea,
[1]Graduate School of Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea,
[2]Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology P.O .Box 115, Taejon, Korea
(Received : 1997. 12. 12., Accepted : 1998. 4. 10.)

A structured kinetic model is proposed to describe cell growth and secondary metabolite, flavone glycosides, synthesis in batch suspension culture of *Scutellaria baicalensis G.* The model has been developed by representing the physiological state of cell described as the activity and viability which can be estimated based on the culture fluorescence. In the model, three type of cells are considered; active-viable, nonactive-viable and dead cells. Viable cell weight could be determined based on the relative fluorescence intensity. The flavone glycosides could be produced by both active-viable and non-active viable cells with a different production rate. And the model includes the cell expansion due to glucose concentration and death phase which accounts for the release of intracellular secondary metabolite into medium. Dependent variables include substrate concentration(glucose), cell mass(dry cell weight and fresh cell weight), product concentration(flavone glycosides), activity and viability. Satisfactory agreement between the model and experimental data is obtained from shake flask culture of *Scutellaria baicalensis G.* The proposed model can predict the cell growth and flavone glycosides synthesis as well as intermediate materials.

Key words : *Scutellaria baicalensis G*, Plant Cell, Structured Model, Flourescence Sensor

서 론

식물은 오랜 세월 동안 인류에게 유용한 물질들의 공급원 역할을 해 왔다. 대부분 이차 대사 산물인 이들 유용한 물질들은 의약품, 향신료, 방향제, 색소, 살충제 및 고순도 화학제품 등 여러 가지 용도로 사용된다. 전체 의약품 시장의 25%, 미국 내에서 만도 매년 90억 달러 이상이 식물로부터 추출된 의약품일 정도로 그 시장성은 높다고 할 수 있다. 현재 이들 생화학 물질의 생산은 식물을 재배하고 추출, 정제함으로써 이루어지고 있는데 이런 재래 공정은 지리적, 기후적, 정책적 영향을 받으며 재배 환경의 변화에도 크게 영향을 받는 단점이 있다. 이러한 단점들을 극복할 수 있는 생물반응기를 이용한 식물 세포 배양은 제어된 환경 하에서 연속적이고 지속적인 대량생산의 가능성 등 여러 가지 장점이 있다. 특히 식물 재배로 추출할 수 있는 생산량이 매우 적으며 재배에 지역적 한계가 있는 고부가가치의 의약품 등의 경우는 세포 배양 기술의 이용 가능성이 매우 크다(1).

많은 생화학 물질들을 식물 세포 배양을 이용하여 성공적으로 얻을 수 있음이 보여졌으나 낮은 생산성 및 늦은 성장 속도, 배양의 불안정성, 대량생산을 위한 Scale-up의 어려움 등으로 상업화 실적은 미미한 형편이다(2). 그러나 일본의 Tobacco company에서는 *Nicotiana tabacum*의 대규모 배양(20kL)에 성공하였고 Andrew J. Schmidt (Washington state univ.) 등에 의해 plant pigment인 Shikonin과 antibiotics인 Berberine의 상업적 생산이 이루어져 식물 세포 배양의 상업화 가능성을 제시하고 있다(2, 3). 그러나 거의 대부분의 식물 세포 배양은 아직도 낮은 생산성 및 느린 성장의 문제점으로 인하여 상업화되지 못하고 있는 실정이다. 따라서 생물 공정 공학적인 측면에서 생산성을 향상시키기 위하여 식물 세포 배양 공정을 배양기 수준에서 모델 링하고 이를 이용하여 최적 기질 농도 궤적을 수립하고 실제 배양기 운전시에 최적 배양 조건을 유지하도록 제어를 수행하는 연구가 필요하다.

본 연구에서 사용한 식물 세포인 황금(*Scutellaria Bai-*

† Corresponding author : Jeong-Woo Choi, Dept. 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

calensis G.)의 뿌리는 염증과 발열에 쓰이는 약초이다. 그리고 간 해독 작용에 효과가 있으며 ether 추출물은 항암제의 상승 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 주요 flavonoid 배당체는 baicalein, baicalin, wogonin, wogonin-7-0-GA 등이다(2,3). 대부분의 항암제는 암세포와 정상 세포 모두에 대하여 독성을 나타내어 여러 가지 부작용이 유발될 뿐만 아니라 약재에 내성을 보이는 세포가 잔존함으로써 기대하는 암치료에 실효를 거두지 못하는 실정이다. 이러한 문제점을 극복하기 위해 황금으로부터 추출한 물질이 P388, L_{1210}, Sarcoma 180 등의 암세포주에 대한 세포 독성 및 항암작용이 있음이 보고되었다. 황금 추출물은 항암제의 부작용을 감소시키고 약재의 내성을 극복 또는 예방할 수 있는 항암제의 상승 효과가 있다(4).

식물세포 배양 공정을 모델링하고 공정 최적화를 위한 기초 자료를 얻기 위하여 식물 세포 배양 공정에서 공정 운전 변수 측정이 필요하다. 식물세포 배양 공정에서 성장할 수 있으며 목적 생산물 생산을 위한 생촉매로서의 작용을 할 수 있는 생존 세포의 양은 배양 공정의 상태를 잘 나타내 주는 확실한 공정 운전 변수이다. 생존 세포의 양을 측정하게 되면 세포의 성장 및 생장을 정확히 예측할 수 있게 되어 살아 있는 세포의 양을 직접 제어함으로써 목적 생산물의 생성을 조절할 수 있게 된다. 식물세포의 분화, 성장과 이차 대사 산물의 생성을 결정하는 중요한 공정 운전 변수인 생존 세포의 양은 광섬유를 이용한 NADH 측정 형광 센서(fluorescence sensor)로서 측정할 수 있다(5-7).

본 연구에서는 *Scutellaria baicalensis G*의 배양시에 생존세포의 양을 형광 센서로써 측정하고, 측정된 비교 형광성(relative fluorescence intensity)을 생존 세포의 양으로 전환할 수 있는 관계식을 개발하여 이를 바탕으로 진보된 구조적 식물 세포 성장 모델식을 제안하고자한다. 제안된 구조적 모델식은 세포의 성장 및 이차 대사 산물의 생산을 정확히 예측할 수 있게 되어 향후 대사 물질 생산의 최대화를 위한 운전 전략의 수립과 공정의 최적화 및 최적 반응기 제어를 위한 기초 자료로 활용될 수 있다.

재료 및 방법

세포 종류 및 배양 방법

*Scutellaria baicalensis G.*의 현탁 배양 및 고체 배양은 고려대학교 생명공학원의 김 익환 교수로부터 제공된 것을 본 연구진이 제공받아 사용하였다. 본 연구에 사용된 *Scutellaria baicalensis G.* 세포를 통하여 baicalin 및 wogonin- 7-0-GA 등의 flavonoid 배당체를 생산하였다. 현탁 세포 배양과 고체 배양을 위하여 Schenk와 Hidebrandt 배지에 2 mg/L의 2,4-D와 1 mg/L의 kinetin을 첨가한 PSH(Phytohormone added Schenk and Hildebrandt) 배지 및 flavonoid 배당체 생산량 증대를 위해 개조된 FPM(Flavonoid Production Medium) 배지를 사용하였다. FPM 배지의 조성은 다음과 같다. 30 g/L glucose, 300 mg/L KNO_3, 200 mg/L $MgSO_47H_2O$, 200 mg/L $NH_4H_2PO_4$, 100 mg/L $CaCl_22H_2O$, 1 mg/L $MnSO_4H_2O$, 1 mg/L $ZnSO_47H_2O$, 5 mg/L $CuSO_45H_2O$, 5 mg/L KI, 1 mg/L H_3BO_3, 0.1 mg/L $Na_2MoO_42H_2O$, 15 mg/L $FeSO_47H_2O$, 20 mg/L Na_2EDTA, 1 mg/L kinetin, 1 mg/L vitamine B_1, 0.25 mg/L vitamine B_6 and 500 mg/L myo-inositol. pH를 5.8로 조정한 배양액 50 mL를 125 mL Erlenmeyer flask에 분주하여 현탁배양을 수행한다. 배양의 초기 접종량은 배양액 50 mL에 대하여 세포 생체 중량으로 1 g의 세포를 접종하였으며 매일 2개의 flask를 세포 중량, flavone glycosides 농도 및 세포의 생존도 측정을 위하여 사용한다. 세포 현탁배양은 shaking incubator(Vison 과학 model 8480 SR)에서 교반속도 180 rpm으로 유지된다. 배양 온도는 25℃이며 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℃에서 건조시킨 후 측정한 무게로서 나타낸다. 기질로서 작용하는 여액 내의 glucose 농도 분석은 spectrophotometer(550nm)를 이용한 DNS(Dinitrosacylic acid) 방법으로 측정한다(8). Flavonoid 배당체의 농도는 Bondapark™ C18 column이 장치된 HPLC를 이용하여 측정하고 이 때의 이동상은 145 mL tetrahydrofuran, 124 mL dioxan, 50 mL MeOH, 20 mL AcOH, 2m L H_3PO_4, 658 mL deionized water으로 이루어지며 유속은 0.8 mL/min이다. UV dectector의 파장대는 270 nm이다(2). 광섬유 형광센서를 이용한 세포의 생존도 측정은 생존 세포 내에 함유된 형광 물질인 NADH를 파장대 350 nm의 빛으로 여기시키면 파장대 460 nm의 빛을 방출한다는 성질을 이용한다. 생존 세포 내의 NADH 의존 형광 세기를 측정함으로써 생존 세포의 양과 생존도를 결정할 수 있게 된다. 이를 위해 NADH 형광 세기 측정용 광섬유 형광센서를 Figure 1과 같이 제작하여 사용하였으며 형광 측정을 수행함에 있어서 광학적 조건은 다음과 같다. detection mode : chart mode(light ingensity vs. time), exposure time : 1.0 sec, No. of Integration : 5, detection : 18.6 min., detection head temperature : 10℃. NADH 형광의 세기는 제시된 측정 조건에 의하여 시간에 따라 측정되었으며, 얻어진 실험결과를 분석하여 형광의 세기가 안정해지는 부분만을 택한 뒤 filtering하여 평균값을 취하였다. 또한, 형광 측정에 따르는 background(광측정기로 들어가는 광을 모두 차단하고 측정한

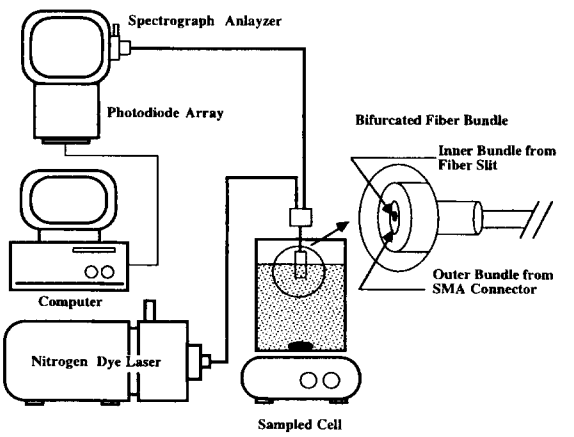


Figure 1. The configuration of fiber-optic fluorescence sensor system.

값)를 측정하여 위와 같은 방법으로 분석하여 NADH형광을 분석할 때 reference로 사용하였다. 이와 같은 형광 신호 분석 방법을 통하여 식물세포 배양 실험에서 상대 형광 세기에 따른 생존 세포량의 변화를 나타내는 형광 측정 실험 결과를 바탕으로 정량 관계식을 수립하였다(9). 광섬유 형광 센서는 크게 세 부분으로 나뉘어 질 수 있으며 이는 다음과 같다. 첫째, 350 nm 파장대의 광을 투사시킬 수 있는 광원 부분과 둘째, 광원으로부터 나오는 빛을 현탁 배양 세포로 전달하는 광전달장치, 마지막으로 여기되어 발산되는 460 nm 대의 NADH 형광을 측정할 수 있는 광측정 장치로 구성되어진다.

모델식

세포의 성장과 flavonoid 배당체 생산 관계를 모델화하기 위하여 다음과 같이 가정한다. 생존 능력에 기초하여 세포를 생존 세포와 죽은 세포로 나누고 생존도(Viability, V)는 전체 세포 건조 중량에 대한 생존 세포 건조 중량의 비로 정의한다. 생존도는 NADH 형광센서의 실험 결과를 해석하여 결정된다. 생존 세포는 다시 분화 능력에 기초하여 분화 가능한 생존 세포와 분화가 가능하지 않은 생존 세포로 나누어진다. 활동도(Activity, A)는 생체 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. 세포의 생존도와 활동도에 따른 구분을 Figure 2에 나타내었다. 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_d로 각각 표현된다. 또한 기질의 농도는 S_G, apigenin의 농도는 a, baicalin의 농도는 b, wogonin-7-0-GA 농도는 w, 그리고 세포의 생체 중량은 X_f로 표현하였다.

정의에 근거하여 활동도, 생존도 및 세포 성장 속도식은 다음과 같다.

$$V = \frac{X_{vd}}{X_d} \tag{1}$$

$$A = \frac{X_{ad}}{X_{vd}} \tag{2}$$

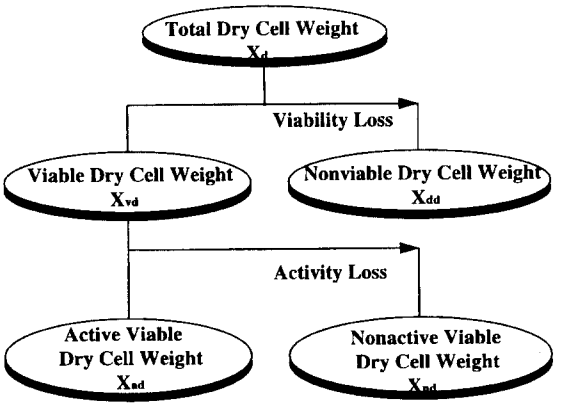


Figure 2. A conceptional diagram of cell classification based on viability and activity.

$$\mu = \frac{\mu_{mG} S_G}{K_G + S_G} \tag{3}$$

여기에서 μ_{mG}는 최대 비성장속도이고 K_G는 Monod 상수이다.

분화 가능한 생존 세포 건조 중량식

$$\frac{dX_{ad}}{dt} = (1 - \exp(-\frac{t}{t_L})) \frac{\mu_{mG} S_G}{K_G + S_G} X_{ad} - k\phi X_{va} \tag{4}$$

$$\phi = \frac{1}{A} \frac{X_f}{X_d} \frac{1}{1 + S_f/X_d} \tag{5}$$

첫 번째 항은 glucose 소모를 통한 세포의 성장을 나타내고 두 번째 항은 활동도의 상실을 나타낸다. 그리고 변수 ϕ는 전단응력에 의해 발생하는 생존도의 상실을 나타낸다. 지수항은 지연상을 나타내기 위하여 사용하였다(10).

비분화 생존 세포의 건조 중량식

분화하지 않는 생존 세포의 감소는 세포 생체 중량의 1차 함수로서 표현되고 비분화 생존 세포에 의한 기질의 소모는 없는 것으로 가정한다.

$$\frac{dX_{nd}}{dt} = k\phi X_{vd} - k_d \frac{X_f}{V} \tag{6}$$

여기서 k_d는 생존 세포의 dead 상수이며, 첫 번째 항은 세포 활동도의 상실을 두 번 째 항은 세포 생존도의 상실을 의미한다.

생존 세포의 건조 중량식

생존 세포의 건조 중량은 분화 가능 생존 세포와 비분화 생존 세포의 건조 중량 합으로 표현된다.

$$X_{vd} = X_{ad} + X_{na} \tag{7}$$

식(4)과 식(6)의 합으로부터

$$\frac{dX_{vd}}{dt} = (1 - \exp(-\frac{t}{t_L})) \frac{\mu_{mG} S_G}{K_G + S_G} X_{ad} - k_d \frac{X_f}{V} \tag{8}$$

생존하지 않은 세포의 건조 중량식

$$\frac{dX_{dd}}{dt} = k_d \frac{X_f}{V} - k_L X_{da} \tag{9}$$

여기에서 k_L은 세포 분해 상수이며, 첫 번째 항은 생존 세포의 건조 중량이 비생존 세포의 건조 중량으로 전환됨을 표현하고 두 번째 항은 비생존 세포의 분해로 세포 중량이 상실됨을 의미한다.

전체 세포의 건조 중량식

전체 세포의 건조 중량은 생존 세포와 비생존 세포의 건조 중량 합으로 표현된다.

$$X_d = X_{vd} + X_{da} \tag{10}$$

(8)식과 (9)의 합으로부터

$$\frac{dX_d}{dt} = (1 - \exp(-\frac{t}{t_L})) \frac{\mu_{mG} S_G}{K_G + S_G} X_{ad} - k_L X_{da} \tag{11}$$

활동도식

활동도는 정의로부터 그 미분식은 다음과 같이 표현되고 식(4)와 식(8)을 대입하면 아래와 같은 식을 얻을 수 있다.

$$\begin{aligned} \frac{dA}{dt} &= \frac{\frac{dX_{ad}}{dt} X_{vd} - X_{ad} \frac{dX_{vd}}{dt}}{X_{vd}^2} \\ &= (1 - \exp(-\frac{t}{t_L})) \frac{\mu_{\max} S_G}{K_G + S_G} \\ &\quad (1 - A)A - k\phi + k_d \frac{AX_f}{V^2 X_d} \end{aligned} \tag{12}$$

생존도식

생존도는 정의로부터 그 미분식은 다음과 같이 표현되고 식(8)와 식(11)을 대입하면 아래와 같은 식을 얻을 수 있다.

$$\begin{aligned} \frac{dV}{dt} &= \frac{\frac{dX_{vd}}{dt} X_d - X_{vd} \frac{dX_d}{dt}}{X_d^2} \\ &= (1 - \exp(-\frac{t}{t_L})) \frac{\mu_{\max} S_G}{K_G + S_G} (1 - V) A V \\ &\quad - k_d \frac{X_f}{V X_d} + k_L (1 - V) V \end{aligned} \tag{13}$$

상대 형광 세기와 생존도 관계식

생존도는 광섬유 형광 센서로부터 측정되는 배양의 상대 형광 세기(FI)로 구해진다.

$$V = \frac{\frac{FI/FI_m}{X_d}}{[\frac{FI/FI_m}{X_d}]^O} \tag{14}$$

기질의 소모속도식

기질은 세포 성장과 대사 물질 생산에 따라 소모됨을 가정하였고 세포 유지를 위한 기질 소모의 항은 생략하였다.

$$\begin{aligned} \frac{dS}{dt} &= -\frac{1}{Y_{X/S_G}} (1 - \exp(-\frac{t}{t_L})) \frac{\mu_{mG} S_G}{K_G + S_G} X_{ad} \\ &\quad - \frac{1}{Y_{a/S_G}} (\alpha X_{ad} + \beta X_{nd}) \end{aligned} \tag{15}$$

여기서 $Y_{X/SG}$는 기질 대 세포의 수득률, $Y_{a/SG}$는 기질 대 대사물질 수득률이다. 첫 번째 항은 세포 성장에 따른 기질의 소모를 표현한 항이고, 두 번째 항은 생산물의 생성에 따라 소모되는 기질을 표현한 것이다.

생성물식

$$\begin{aligned} \frac{da}{dt} &= \alpha X_{ad} + \beta X_{nd} - Y_{a/b} k_3 \frac{a}{k_{3b} + a} X_{vd} \\ &\quad - Y_{a/w} k_4 \frac{a}{k_{4w} + a} X_{vd} \end{aligned} \tag{16}$$

$$\frac{db}{dt} = k_3 \frac{a}{k_{3b} + a} X_{vd} - \lambda_3 X_{da} \tag{17}$$

$$\frac{dw}{dt} = k_4 \frac{a}{k_{4w} + a} X_{vd} - \lambda_4 X_{da} \tag{18}$$

식(16)의 첫 번째 항은 flavonoid 배당체의 중간물질인 apigenin의 생성을, 두 번째, 세 번째 항은 각각 baicalin과 wogonin-7-0-GA의 생성으로 apigenin이 소모됨을 나타낸다. 식(17),(18)의 첫 번째 항은 각각 baicalin과 wogonin-7-0-GA의 생성을 의미하고 두 번째 항은 각각 세포의 소멸로 유출된 효소에 의한 생성물질의 분해를 나타낸다.

세포의 생체 중량식

세포의 생체 중량은 배양액 내의 당농도와 건조 세포 중량에 의해 영향을 받는다. 건조 세포 중량의 증가에 따라 증가하고 세포가 분해됨에 따라 감소한다.

$$\begin{aligned} \frac{dX_f}{dt} &= (1 - \exp(-\frac{t}{t_L})) k_1 X_{ad} \\ &\quad - k_2 k_L X_{dd} - \theta(S_G) X_d \end{aligned} \tag{19}$$

$$\theta(S_G) = x \exp(1 - \frac{S_G}{S_{G0}}) \tag{20}$$

여기서 k_1은 생체 중량 증가 상수, k_2는 세포 분해에 따른 생체 중량의 감소 상수, θ는 당농도 영향을 받는 삼투압에 의한 세포의 팽창에 관한 함수이다. 첫 번째 항은 세포 성장의 영향을 표현한 항이고, 두 번째 항은 세포의 분해를 나타낸다. 세 번째 항은 삼투압 현상에 의한 세포의 팽창을 고려한 것이다.

매개변수 추정

수립된 모델 식들은 미분식으로서, 모델에 사용된 매개변수들

Table 1. List of the structured model parameters of *Scutellaria baicalensis G.* in batch culture.

Parameter	Dimension	Value	Parameter	Dimension	Value
μ_{max}	1/day	0.4520	λ_3	1/day	0.0639
K_S	g/L	0.7910	λ_4	1/day	0.0268
k	1/day	0.0286	$Y_{a/b}$	g/g	0.0695
$Y_{X/S}$	g/g	0.7160	$Y_{a/w}$	g/g	0.0312
$Y_{a/S}$	g/g	0.3320	k_3	g/g day	0.0472
k_L	Dimensionless	0.0307	k_4	g/g day	0.0196
k_1	1/day	3.9130	K_{3b}	g/g day	0.0003
k_2	1/day	10.8000	K_{4w}	g/g day	0.0004
k'	1/day	0.4310	t_L	day	1.0000
α	1/day	0.0047	S_0	g	29.2000
β	1/day	0.0014	k_d	1/day	0.0055

은 비선형 매개변수 추정 기법을 이용하여 얻어진다(11, 12). 매개변수의 추정이 이루어지는 동안 Runge-Kutta-Verner sixth-order 방법을 이용하여 미분식의 수치적분으로 동시에 해를 구하게 된다(13). 매개변수 값들은 실험 결과와 모델식의 결과가 가장 잘 일치하는 경우의 것으로 결정되고 결정된 매개변수 값을 Table 1에 나타내었다.

결과 및 고찰

glucose 농도의 영향

모델식 구성을 위한 현탁 세포 배양 실험을 수행하기에 앞서 기질 제한의 영향을 조사하기 위하여 최적 기질 농도 결정을 위한 실험을 수행하였다. 10 g/L에서 40 g/L에 이르는 다양한 초기 glucose 투여량에 따라 세포의 성장, 기질의 소모 및 flavonoid 배당체의 생산량을 접종 후 8일에서 14일까지 측정하였다. 측정된 세포 건조 중량, 잔존 glucose 농도, baicalin 생산량 및 wogonin-7-0-GA 생산량을 Figure 3에 나타내었다. 초기 glucose 접종량이 30 g/L 이상인 경우에는 배양 말기까지 소비되지 않는 glucose가 존재하는 것으로 나타났으며 초기 glucose 접종량이 30 g/L보다 낮은 경우에는 flavonoid 배당체 생산량이 30 g/L인 경우보다 낮게 나타났다. 실험 결과에 따라 배지내 잔존하는 glucose를 제거하고 flavonoid 배당체의 생산량을 높일 수 있는 30g/L로 glucose농도를 결정하여 형광측정 실험을 수행하였다.

Fluorescence 측정

Figure 4 (a)는 NADH 형광 센서를 이용한 생존 세포량 측정에 관한 실험 결과로서, NADH 상대 형광세기와 생존 세포 건조 중량과의 관계는 지수 성장 단계에서 선형으로 나타나고 정체상 단계에서는 선형성이 떨어지는 것으로 나타난다. 이는 형광 세기가 생존 세포량에 관계되는 것이기 때문이다. 따라서 선행된 형광 세기와 생존 세포량과의 정량 실험을 통하여 생존 세포의 양을 계산할 수 있게 된다. 형광 세기와 생존 세포량과의 정량식을 구하기 위하여 초기 지수 성장 단계에 있는 식물 세포를 크기 50 μm에서 1 mm인 나일론 체에 걸려 대략적인 생존 세포의 양을 결정하고 tetrazolium chloride로써 생존도를 분석한다(14). 식물 세포는 상당 크기의 응집체를 형성하는 경우가 흔하고 응집체 내부에 존재하는 대부분의 식물 세포들은 기질 공급의 차단으로 인해 사멸하게 된다. 초기 지수 성장 단계에 있는 식물 세포의 응집체를 체에 의해 분리시키면 대략적인 생존 세포량을 측정할 수 있으며 또한 배양의 상대 형광 세기는 구성된 형광센서를 통해 측정할 수 있게 된다. Figure 4 (b)는 생존 세

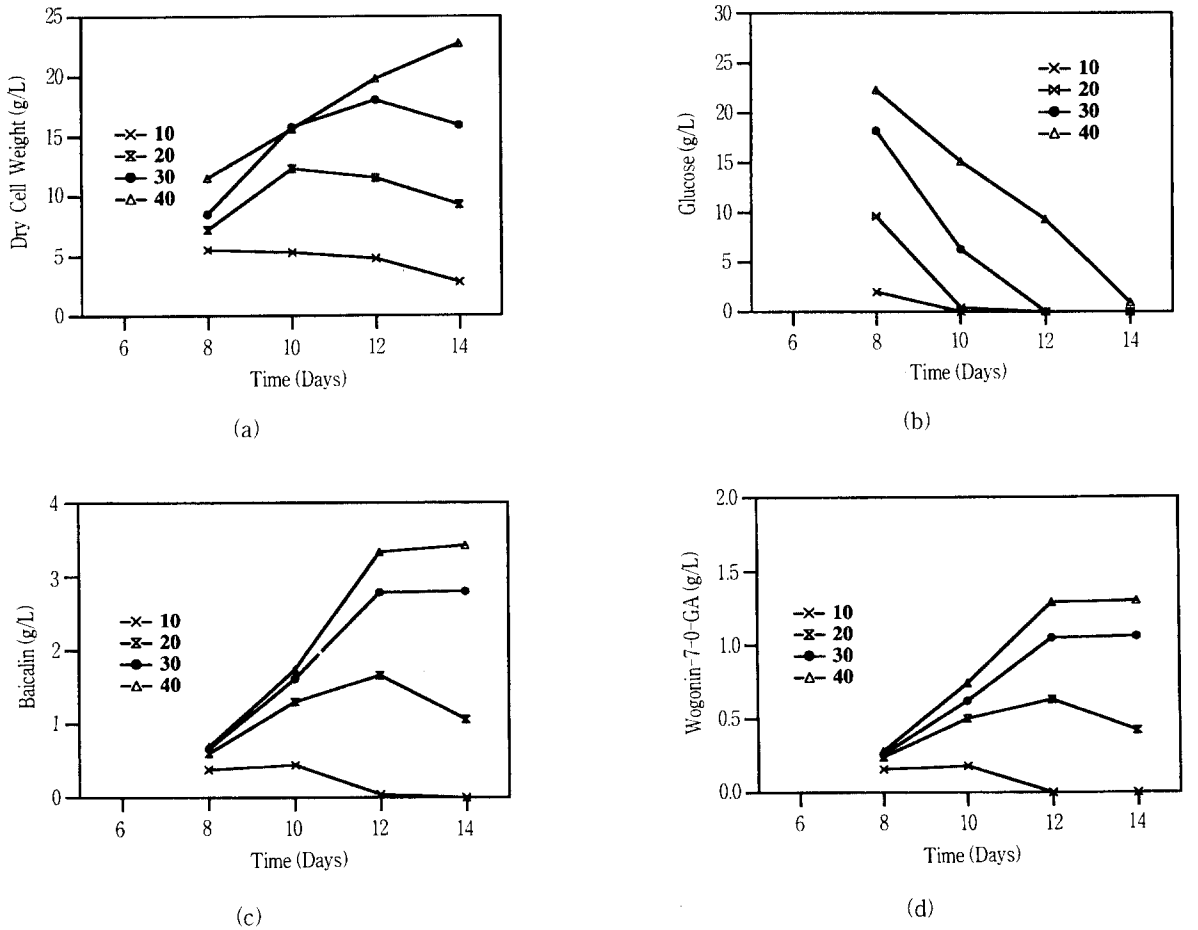
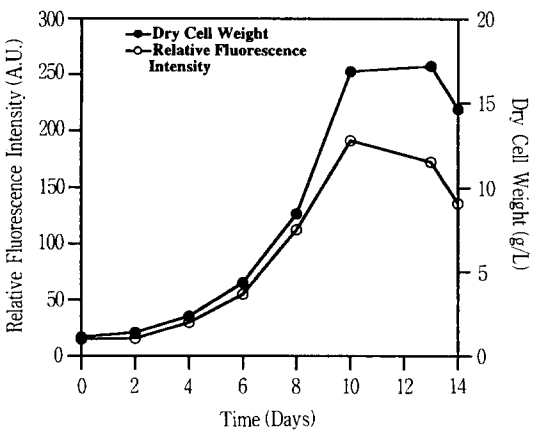
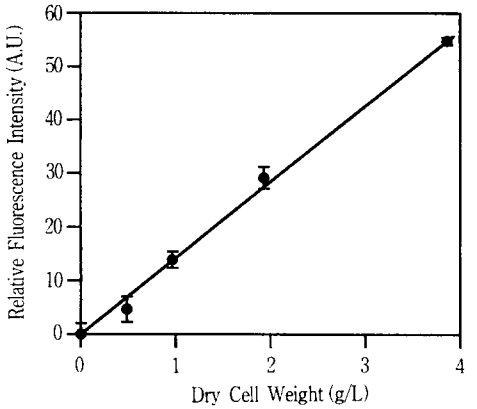


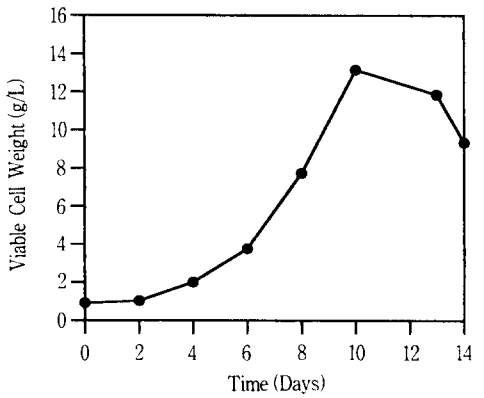
Figure 3. Effect of glucose concentration on (a) cell growth (b) glucose uptake (c) baicalin productoin and (d) wogonin-7-0-GA production.



(a)



(b)



(c)

Figure 4. Experimental results of NADH detection using a fluorescence sensor in batch culture (a) time course change of dry cell weight and fluorescence intensity in batch culture (b) calibration curve for fluorescence intensity and viable cell mass (c) time course change of viable dry cell weight in batch culture.

포 중량의 함수로써 상대 형광 세기의 관계를 나타낸 것으로 본 실험에서의 생존도 결정 및 생존 세포 중량 결정에 정량 관계식을 제공한다. 생존 세포의 중량은 세포 내에 존재하는 NADH 양에 관계하므로 NADH에 의한 형광을 측정함으로써, 전체 세포 중량에서 차지하는 생존 세포의 양을 추정할 수 있다. Figure 4 (c)는 배양 14일간 광섬유 형광센서로 상대 형광세기를 측정하여 상대 형광 세기와 생존 세포 중량과의 정량 곡선으로부터 생존 세포 중량을 결정한 것이다. 생존 세포 중량은 접종 후 10일 경에 최대가 되었으며 이후 점차 감소하였다.

Scutellaria baicalensis G. 식물 세포 현탁 배양 실험 결과 및 모델 현상 모사 결과

Figure 5는 *Scutellaria baicalensis G.* 식물 세포의 현탁 배양에서 세포의 성장과 기질의 소모, flavonoid 배당체 생산에 대한 실험 결과와 모델의 현상 모사 결과이다. 실험값의 오차범위는 10% 이내이다. 세포 성장을 나타내는 세포의 건조 중량과 생체 중량 변화를 보면 접종 후 1일 정도의 지연상을 보이며 4일 이후 급격한 성장을 보이고 세포의 건조 중량이 10일 경에 최대에 이르게 됨을 볼 수 있다. 12일 이후 세포의 성장이 둔화되고 기질의 농도가 0으로 떨어짐을 볼 수 있다. 또한 flavonoid 배당체의 생산 변화는 12일 경에 최대량에 도달하고 이 후 서서히 감소함을 볼 수 있다. 이는 flavonoid 배당체의 생산 형태가 혼합 연계 성장임을 나타내는 것이다. 이러한 세포의 성장과 flavonoid 배당체의 생산 그리고 이를 위한 기질의 소모 등에 관한 실험 결과와 앞서 제안한 모델식의 현상모사 결과가 잘 일치하는 것을 볼 수 있다. 특히 제안된 모델식은 세포의 건조 중량과 생체 중량의 비율 변화와 flavonoid 배당체의 혼합 연계 생산 특성을 잘 설명하고 있음을 알 수 있다.

추정된 매개변수와 모델식을 통하여 세포 내외의 생산물질 뿐만 아니라 세포의 성장과 flavonoid 배당체 생산에 관한 배양 실험 결과를 정확히 예측할 수 있다. 제안된 모델식은 *Scutellaria baicalensis G.* 식물 세포 배양 공정에서 flavonoid 배당체 생산을 극대화하기 위한 운전 전략의 수립과 공정 최적화를 위한 기초 자료를 제공할 뿐만 아니라 식물 세포 배양 공정의 제어 분야에도 기여할 것으로 사료된다.

요 약

Scutellaria baicalensis. G. 식물 세포의 현탁 배양에서 세포의 성장과 flavonoid glycosides 생산에 관한 구조적 성장 모델을 제안하였다. 제안된 모델식은 현탁 배양의 형광을 측정함으로써 결정될 수 있는 세포 생존도와 세포 활동도 등을 세포의 생리학적 변수로서 고려하였다. 제안된 모델식에서는 세포의 상태에 따라 세포를 크게 생존 세포와 비생존 세포로 나누고 생존 세포를 분화 가능한 생존 세포와 비분화 생존 세포로 나누어 각각의 모델을 구성하였다. 이 중 생존 세포 중량은 광섬유 형광센서로 측정한 상대 형광 세기로부터 결정될 수 있었다. Flavonoid 배당체의 생산 속도는 분화 가능한 생존 세포와 비분화 생존 세포에 의해 지배되며, 배양액의 삼투압에 의한 세포 팽창과 세포내 생성물질의 방출은 비생존 세포에 의해 이루어진다고 가정하였다. 종속변수는 기질농도(포도당), 세포 중량(건조 세포중량과 생체중량), 대사산물농도(flavone glycosides), 활동

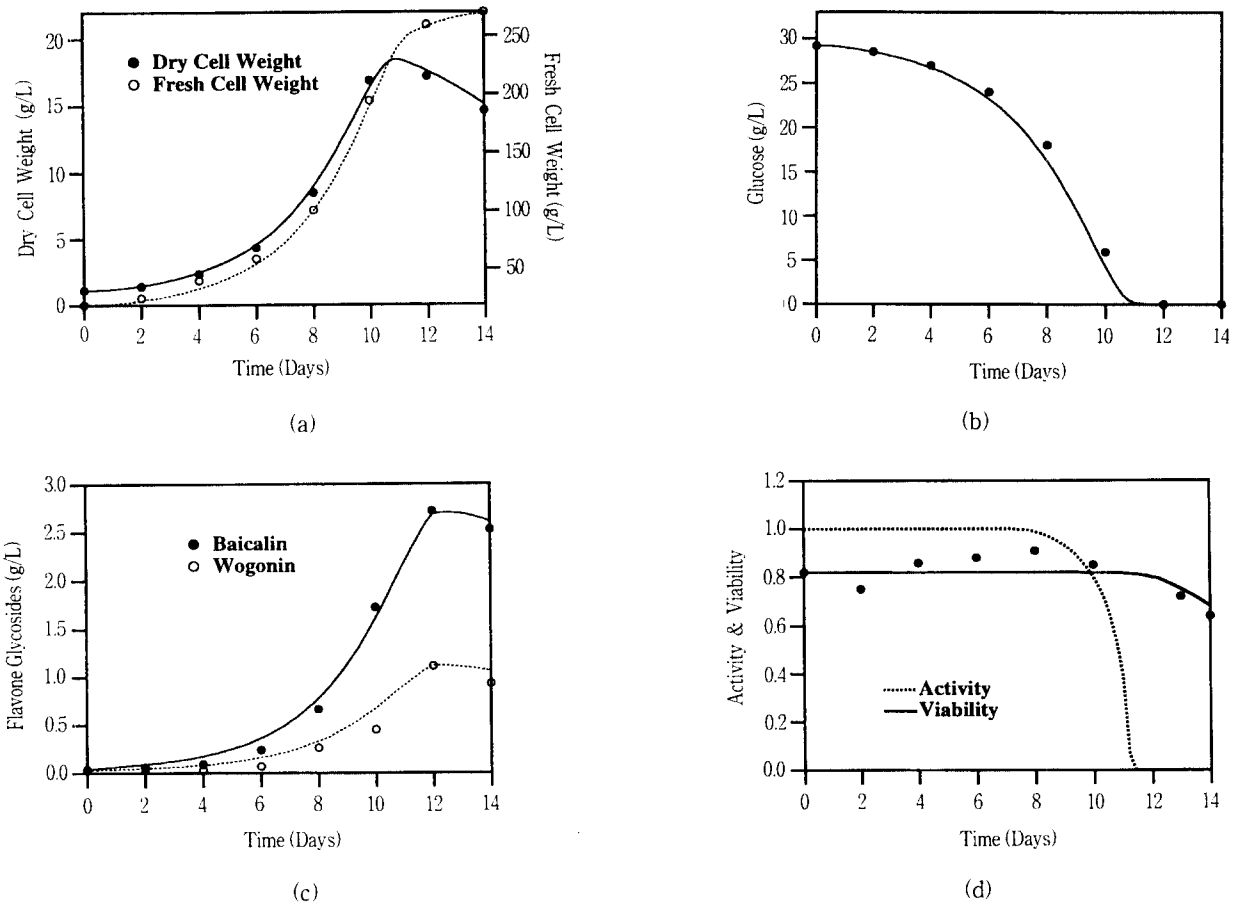


Figure 5. Comparison of experimental and simulation results of *Scutellaria baicalensis G.* batch culture (a) dry cell weight and fresh cell weight (b) glucose concentration (c) baicalin and wogonin-7-0-GA concentration (d) activity and viability

도와 생존도를 포함한다. *Scutellaria baicalensis. G.* 식물 세포의 플라스크 배양으로부터 모델과 실험결과가 잘 일치함을 알 수 있었다. 제시된 모델은 세포의 성장, flavone glycosides 및 중간매개체 합성을 예측할 수 있다.

사 용 기 호

A : activity (g/g)
FI : relative fluorescence intensity
k : rate constant (1/day)
k_d : death 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

α : 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
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-7-0-GA

a/b : apigenin to baicalin

Superscript

o : initial

참 고 문 헌

1. Sahai O. and M. Knuth (1985), Commercializing Plant Tissue Culture Process Economics, Problems and Prospects, *Biotechnol. Prog.*, **1**, 1-9.
2. 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 Reports*, **12**, 414-417.
3. Lee Y. Y., K. H. You, S. Y. Kim and B. J. Ahn (1991), Augmentation of Cytotoxic Effects of Anticancer Drugs by (±)-ar-Tumerone and Extracts of the *Lithosperma and Scutellaria* Roots against Leukemia Cell Lines, 약학회지, **35**, 203-215.
4. Hulst A. C. and J. Tramper (1989), Immobilization Plant Cells; a literature survey, *Enzyme Microb. Technol.*, **11**, 546-558.
5. Junker B. H., D. I. C. Wang, and T. A. Hatton (1988), Flourescence Sensing of Fermentation Parameters Using Fiber-Optics, *Biotechnol. Bioeng.*, **32**, 55-63.
6. McCarty John F. and Richard L. Magin (1992), A Fiber-Optic System for Measuring Single Exciatation-Dual Emission Fluorescence Ratios in Real Time, *Biotechnol. Pro.*, **8**, 360-368.
7. Zabriskie D. W. and A. E. Humphrey (1978), Estimation of Fermentation Biomass Concentration by Measuring Culture Fluorescence, *Appl. Environ. Microbial.*, **35**, 337-343.
8. Miller G. L. (1959), Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar, *Anal. Chem.*, **31**, 426-428.
9. 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.
10. Moser A. (1984), Bioprocess Technology: Kinetics and Reactors, 2nd ed., Springer-Verlag, NY..
11. Seinfeld J. and L. Lapidus (1970), Process Modeling, Estimation and Identification, pp.383, Prentice-Hall, New Jersey.
12. Metzler C. M., G. L. Elfring and A. J. McEwen (1974), A Package of Computer Programs for Pharmacokinetic Modeling, *Biometrics*, **30**, 562-563.
13. IBM Co. Technical Publications Department (1970), System/360 Scientific Subroutine Package Programmer's Manual, 5th ed, pp.337-343., IBM Co. Tech. Pub. Dep., NY..
14. Dixon R. A. (1986), Plant Cell Culture: A Practical Approach, pp.19, IRL Press, Oxford.