

주목세포배양에 의한 Taxol 생산: 여러 가지 Elicitor가 미치는 영향

윤정환·김진훈·황용순·*변상요·†김동일
인하대학교 공과대학 생물공학과, *아주대학교 공과대학 생물공학과

Taxol Production in *Taxus* Cell Cultures: Effects of Various Elicitors

Jeong-Hwan Yun, Jin-Hoon Kim, Yong-Soon Hwang
Sang-Yo Byun* and Dong-Il Kim †

Department of Biological Engineering, College of Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea

*Department of Biotechnology, College of Engineering, Ajou University, Suwon 441-749, Korea

ABSTRACT

The effects of various elicitors, metabolic inhibitors and growth regulators on the production of diterpenoid anticancer agent taxol were investigated in cell suspension cultures of *Taxus brevifolia*. Cell cultures of *T. brevifolia* were treated by 5 kinds of biotic elicitors, 5 kinds of abiotic elicitors, 2 kinds of metabolic inhibitors and 8 kinds of growth regulators at the end of exponential growth phase. Among those treatments, chlorocholine chloride—an inhibitor of plant steroid metabolism—increased the taxol production most significantly. From a series of optimization studies, it was found that the addition of 1mM of chlorocholine chloride at the 9th day of culture was the best for taxol production. Taxol yield under this condition was 0.72mg/ℓ.

서 론

Taxol은 구조가 복잡한 diterpenoid alkaloid로서 유방암과 난소암에 탁월한 항암효과가 있는 것으로 알려져 있다(1-3). Taxol은 주목의 수피로부터 추출하여 얻을 수 있는데, 주로 태평양주목(Pacific yew, *Taxus brevifolia*)이 이용되고 있다. 태평양주목은 높이 7~13m, 직경 5~10cm의 목본식물로 생장이 느리고 taxol의 함량이 낮아서 많은 양을 벌목해야만 충분한 양의 taxol을 얻을 수 있다. 따라서, taxol의 수요를 충족시키기 위해서는 대체공급

방안이 필요한 실정이며(4), 전합성 및 반합성, 일에서의 추출, 유사물질의 개발, 미생물의 이용, 식물 세포배양에 의한 생산 등을 제시할 수 있다.

화학적으로 전합성 또는 반합성하는 방법은 Nicolaou 등(5)에 의하여 성공한 사례가 있으나, 복잡한 화학구조로 인해 수많은 반응단계를 거쳐야 하고 반합성의 경우 필요한 전구체를 얻기 위해서는 주목으로부터 기존의 방법대로 추출해야 하는 단점이 있다. 주목의 잎은 재생 가능한 공급원으로서의 장점을 지니고 있으나, taxol의 함량이 수피에 비해 낮고 색소나 wax같은 불순물을 다량 함유하고 있어 분리·정제에 많은 어려움을 준다. Taxol 생성능이 있는 미생물에 대해서는 Stierle 등(6)에 의해 보고

† Corresponding Author

된 바 있으나 생성되는 양이 매우 낮은 수준이어서 생산성을 높이기 위해 선행되어야 할 연구가 산재해 있는 형편이다.

식물세포배양을 이용하여 유용한 2차대사산물을 생산해내고자 하는 시도는 큰 잠재력을 지니고 있으나 생성 경로에 대한 지식이 부족하고 그 수율도 낮아서 실제로 성공한 사례는 많지 않다. 대부분의 2차대사산물은 세포가 영양의 고갈이나 환경의 변화 또는 미생물에 의한 오염과 같은 stress를 받을 때 축적되기 시작하는 것이 보통인데 식물세포배양에 있어서 2차대사산물의 생성을 촉진시키기 위해 임의의 stress를 가하는 것을 광범위한 의미로 elicitation이라고 하며 이때 가해지는 stress를 elicitor(유인제)라고 한다. Elicitor는 크게 생물에서 유래되는 biotic elicitor와 무생물에서 유래되는 abiotic elicitor로 구분된다(7). 식물세포배양에서 이들 elicitor와 대사억제제 및 성장조절제를 처리하여 목적산물의 생산성을 증대시킨 결과가 다수 보고되고 있는데(8-12) 식물세포의 종류에 따라 효과있는 elicitor의 종류도 다르고 처리농도와 처리시기에 의해서도 그 영향이 달라지므로 이에 대한 최적화가 이루어져야 한다.

본 연구에서는 *Taxus brevifolia* 현탁세포배양을 통한 taxol의 생산에 있어서 생산성을 향상시키는 인자를 찾기 위해 5종류의 biotic elicitor와 5종류의 abiotic elicitor, 2종류의 대사억제제, 그리고 8종류의 성장조절제 등을 처리하여 taxol의 생산 증대에 효과있는 물질을 선별하였다.

재료 및 방법

세포배양 및 배지

본 연구에 사용한 *Taxus brevifolia* 세포는 Dr. Henrik Pedersen(Rutgers University, U.S.A.)으로부터 제공받은 태평양주목에서 유도하였다.

Schenk와 Hildebrandt 기본배지에 α -naphthaleneacetic acid(NAA) 5mg/l, 6-benzylaminopurine(BAP) 0.2mg/l, 그리고 자당 20g/l를 첨가하고 1N NaOH로 pH를 5.8로 조정하고 후 가압증기멸균하여 *T. brevifolia*의 현탁세포배양에 사용하였다. 계대배양은 10일 간격으로 수행하였으며, 250ml Erlenmeyer flask에 100ml의 배지에 접종하고 암소의 회전식 진탕배양기에서 120rpm, 25°C로 유지하였다.

각 elicitor들의 효과를 실험하기 위해서는 100ml

Erlenmeyer flask에 30ml의 배지를 넣고 생체중량(Fresh weight, FW)으로 5g의 세포를 접종하여 10일간 배양하고, 각 elicitor를 처리한 후 3일 뒤에 수확하였다.

세포농도 측정

세포농도를 결정하기 위해서는 생체중량과 세포건조중량(Dry cell weight, DCW)의 두 가지 측정을 시행하였다. 먼저 배양액을 Buchner 깔때기를 이용하여 Whatman No. 1 여과지로 걸러내고 동량의 물로 두 번 세척한 후 수분을 제거하고 세포를 계량 접시에 옮겨 화학저울로 FW를 측정하였다. FW를 측정 후 60°C 건조기에서 항량이 되도록 건조하여 DCW를 측정하였다.

Fungi 균주, 배지 및 배양조건

본 실험에서는 fungal elicitor로서 *Phytophthora megasperma*와 *Aspergillus niger*, 그리고 *Penicillium chrysogenum*을 사용하였다. *P. megasperma*는 한국미생물보존센터(Korean Culture Center of Microorganism, KCCM)로부터 구입하였고, *A. niger*와 *P. chrysogenum*은 KIST 유전공학연구소 유전자은행(Korean Collection of Type Culture, KCTC)으로부터 구입하였다.

*P. megasperma*는 asparagine 배지(13)에 접종하여, 균사체가 배지표면을 완전히 덮을 때까지 25°C에서 수일간 정치배양하였다. *A. niger*와 *P. chrysogenum*은 malt extract 20g/l, glucose 20g/l, peptone 1g/l 조성의 배지에 접종하여 *P. megasperma*와 같은 방법으로 배양하였다. 이 때 배양 도중 균사체가 배지표면에 고루 퍼지도록 하기 위하여 flask를 3일 간격으로 흔들어 주었다.

Fungi 유래 Elicitor의 제조

배양된 곰팡이를 elicitor로 사용하기 위하여, 배양액을 Whatman No. 1 여과지로 흡입여과한 후 3차 증류수로 수차례 세척하였다. 세척된 균사체를 모아 60°C의 dry oven에서 충분히 건조시킨 후 질량을 측정하고, 10g/l가 되도록 3차 증류수를 가한 뒤 Waring blender로 분쇄시켰다. 이것을 가압증기멸균하여 elicitor로 사용하였다(14).

Yeast Elicitor의 제조

Yeast elicitor는 Difco사에서 구입한 yeast extract로부터 알코올 침전법에 의해 분리하였다(15).

200g의 yeast extract를 1ℓ의 3차증류수에 녹이고 ethanol을 80%(v/v)가 되도록 가한 뒤 6℃에서 4일 동안 냉장보관하였다. 이때 생성된 침전을 제외한 상등액은 버리고, 침전을 다시 1ℓ의 3차증류수에 녹여 알코올 침전법을 반복하였다. 다시 생성된 침전을 800ml의 3차증류수에 녹이고 6℃에서 투석하여 투석막 내에 형성된 침전은 1.2 μ m Millipore filter로 여과하고, 여과액에 다시 60%(v/v)가 되도록 ethanol을 가한 뒤, 형성되는 침전을 21,500 \times g로 15분간 원심분리하여 제거하였다. 이 때 얻어지는 상등액을 모아 40℃에서 회전진공증발시켜 350ml의 용액으로 만들고 가압증기멸균하여 사용하였다. 이 yeast elicitor의 총당함량은 phenol sulfuric acid법으로 측정하였다(16).

Taxol 및 당분석

용매를 이용한 추출방법은 Wani 등(1)이 기술한 방법을 이용하였다. 각 시료마다 세포와 배지를 포함한 전체 배양액과 동량의 CH₂Cl₂를 첨가한 후 1시간 동안 270W/43kHz로 초음파 파쇄하였다. 상분리 후에 CH₂Cl₂ 층에서 10ml를 취하여 용매를 감압증발시킨 후 HPLC-grade MeOH에 다시 녹이고 0.45 μ m filter를 이용하여 불순물을 걸러내었다. HPLC 분석을 위해서는 영인 system(영인과학, 서울)에 reverse-phase column(Curosil-G, 6 μ m, 250 \times 4.6mm, Phenomenex, U.S.A.)을 사용하였다. 전개용매의 조성은 MeCN:H₂O가 40:60으로 하였고 isocratic 조건에서 분석하였다. 용매의 유속은 1.5ml/min였으며 227nm에서 UV 흡광도를 측정하였다. 배지내의 총당 분석은 phenol sulfuric acid법을 사용하였다(16).

결과 및 고찰

*Taxus brevifolia*의 생장 특성

일반적으로 elicitor는 세포의 대수증식기 말기에 처리할 때 가장 두드러진 효과를 보이는 것으로 알려져 있으므로(17), *T. brevifolia*의 생장특성을 파악하여 elicitor처리시기를 결정하고자 하였다. Fig. 1은 *T. brevifolia* 현탁세포배양시 경시적 생장 및 당소비 변화를 나타낸 것으로서, 세포조건중량에 따른 세포의 생장은 접종 후 13일까지 증가하다가 그 후 감소하는 경향을 보였다. 비생장속도는 0.062day⁻¹이었고 배가시간(doubling time, T_d)은 11.2day였다. 이 결과를 근거로 이후에는 세포접종 후 10일이

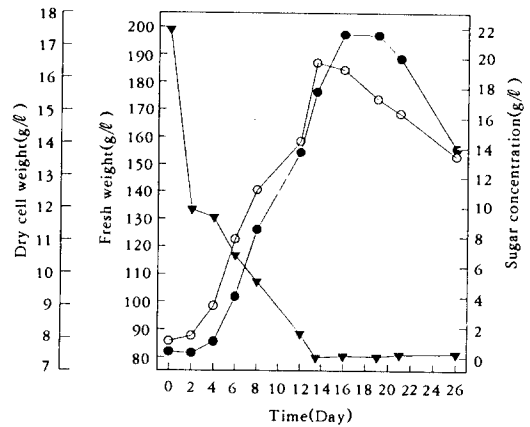


Fig. 1. Time course changes of cell growth and sugar consumption in *Taxus brevifolia* cell suspension cultures (○, dry cell weight; ●, fresh weight; ▼, sugar concentration).

되었을 때 elicitor를 처리하고 3일 후 수확하여 taxol생산에 대한 효과를 살펴 보았다.

Taxol의 HPLC 분석

Fig. 2(a)는 미국 NCI(National Cancer Institute)로부터 제공받은 taxol 및 관련 taxane들의 혼합표준용액의 HPLC 크로마토그램이다. 각 물질은 methanol(HPLC-grade)을 사용하여 10ppm의 농도로 제조되었으며 이들의 retention time은 10-deacetyl baccatin III:3.01분, baccatin III:5.38분, 10-deacetyl taxol:10.83분, cephalomannine:17.31분, 7-epi-10-deacetyl taxol:19.22분, taxol:22.10분으로 확인되었다.

주목현탁세포배양으로부터의 taxol 추출과 같은 방법으로 식물체 주목으로부터 taxol을 추출하고 HPLC로 분석한 결과는 Fig. 2(b)와 같다.

Fig. 2(c)는 주목 현탁배양세포를 추출하여 HPLC로 분석한 크로마토그램이다. 식물체 추출액의 분석결과에서는 보이지 않던 물질들의 peak가 taxol의 retention time 이후에 감지되는 것을 확인할 수 있으며 배양세포의 대사가 식물체와는 차이가 있음을 간접적으로 알 수 있었다.

여러 가지 Elicitor가 Taxol 생산에 미치는 영향

본 연구에서는 biotic elicitor로서 yeast elicitor, *P. megasperma*, *A. niger*, *P. chrysogenum*, chitosan

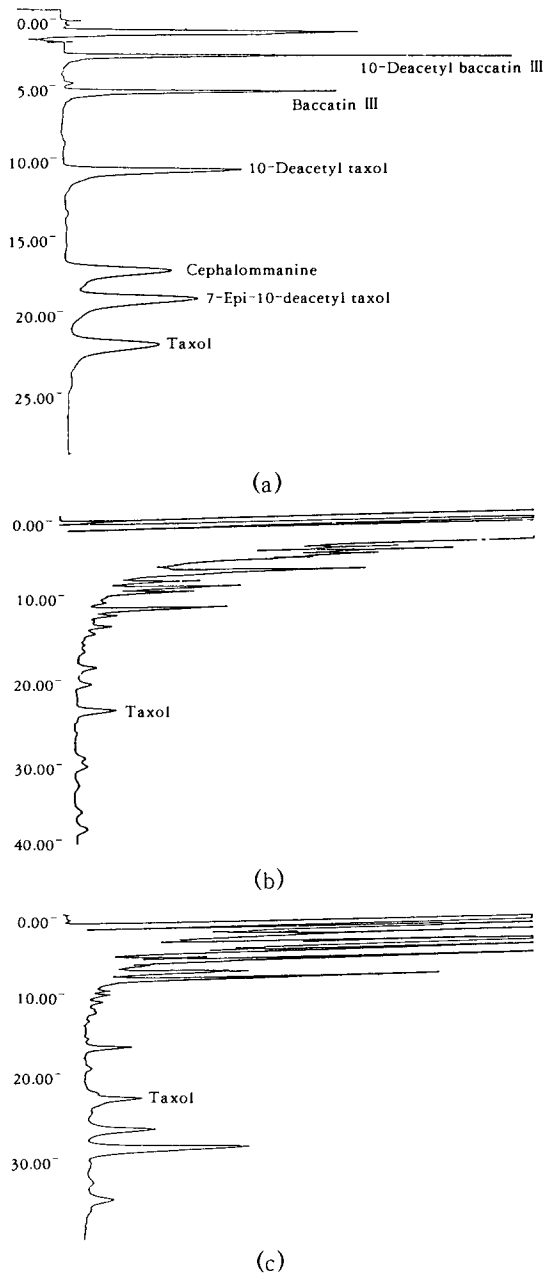


Fig. 2. (a) HPLC chromatogram of 10ppm standard mixture of taxol and related taxanes, (b) HPLC chromatogram of methanol extracts from intact yew plant, (c) HPLC chromatogram of methanol extracts from suspension cells of *T. brevifolia*.

을 사용하였고 abiotic elicitor로서 중금속염인 $HgCl_2$, $CuCl_2$, $CuSO_4$, $VOSO_4$ (vanadyl sulfate)를 사용하였는데, 각각의 처리량과 taxol 생산에 미치는 효과를 Table 1에 정리하였다. Elicitor를 처리하지 않은 대조군에서는 taxol이 검출되지 않으나 biotic elicitor 중에서 *P. megasperma*를 처리했을 때 taxol 생산이 증가되었으며 이때의 taxol 함량은 0.28ppm이었다. 그외의 biotic elicitor들의 경우, taxol 생성의 증대에는 별다른 효과를 보이지 않았다. Abiotic elicitor들 중에서 중금속염을 처리하였을 때에도 taxol 생성을 유도하지 않았는데, 중금속염을 처리한 뒤 24시간 이내에 배양액의 색이 심하게 갈변화하는 것으로 보아 중금속염의 독성에 의해 세포가 급속히 생리적인 활성을 잃었기 때문인 것으로 생각된다.

Kuhn 등(18)은 UV조사가 parsley cell의 phenylpropanoid 대사를 증진시킨다고 보고하였으나 *T. brevifolia* 현탁세포배양에 5시간 동안 UV를 조사한 결과 taxol의 생산에는 별다른 변화가 보이지 않았다.

여러 가지 대사억제제가 Taxol 생산에 미치는 영향

Strobel 등(2)은 steroid계 대사억제제 chlorocholine chloride를 *T. brevifolia*의 내피조직에 처리하는 것이 taxol의 생산을 증진시킨다고 보고하였다. 또한 phenylalanine ammonia lyase의 억제제인 urea는 phenolics의 축적을 억제하고 phenolics

Table 1. Effect of various elicitors on taxol production in *Taxus brevifolia* cell suspension cultures.

Elicitor	Dose	Effect
Biotic elicitors		
Yeast elicitor	0.29 mg/g FCW	-
<i>Aspergillus niger</i>	2 mg/g FCW	-
<i>Penicillium chrysogenum</i>	2 mg/g FCW	-
<i>Phytophthora megasperma</i>	2 mg/g FCW	+
Chitosan	200 mg/g FCW	-
Abiotic elicitors		
$HgCl_2$	0.12 mg/g FCW	-
$CuCl_2$	0.12 mg/g FCW	-
$CuSO_4$	0.12 mg/g FCW	-
$VOSO_4$	0.12 mg/g FCW	-
UV	5 hours	-

-, not detected; +, more than 0.2ppm of taxol produced.

Table 2. Effect of metabolic inhibitors on taxol production in *Taxus brevifolia* cell suspension cultures.

Metabolic Inhibitor	Dose	Effect
Chlorocholine chloride	0.1mM	+++
Urea	0.1mM	+

+, more than 0.2ppm of taxol produced; +++, more than 0.6ppm of taxol produced.

Table 3. Effect of various growth regulators on taxol production in *Taxus brevifolia* cell suspension cultures.

Growth Regulator	Dose	Effect
2,4-D	0.8mM	-
5-azacytidine	0.1mM	-
ABA	0.6mM	-
Adenine	1.2mM	-
Ancymidol	0.1mM	-
BAP	0.7mM	-
Ethephon	0.1mM	+
GA	0.5mM	-

-, not detected; +, more than 0.2ppm of taxol produced.

의 전구체인 phenylalanine을 단백질대사경로로 유도하는 효과가 있다고 보고되었다(19). 따라서 taxol 합성에 이용되는 공통의 전구체를 소모하는 steroid나 phenolics의 합성을 억제하여 taxol 생산을 증대시키기 위한 목적으로 chlorocholine chloride와 urea를 *T. brevifolia*의 현탁세포배양에 처리하여 보았다. 그 결과 chlorocholine chloride가 taxol 생산을 크게 증대시켰으며 urea도 약간의 효과가 있음이 확인되었다 (Table 2).

여러 가지 생장조절제가 Taxol 생산에 미치는 영향 Smith 등(20)에 의하면 식물호르몬인 abscisic acid (ABA)와 gibberellic acid(GA)를 *Catharanthus roseus*의 현탁세포배양에 첨가할 경우 indole alkaloid의 생산성 증대에 효과가 있다고 한다. Ethephon은 식물호르몬인 ethylene의 방출물질인데, Songstad 등(21)은 *Papaver somniferum* 현탁세포배양에 의한 sanguinarine 생산에 있어서 ethylene이 sanguinarine의 생합성신호로서의 의미를 지니고 있는지 알아보기 위해 ethylene을 공급하기 위한 방법으로 ethephon을 사용한 바 있다. 5-azacytidine은 nucleoside analogue로서 세포분화의 강력한 촉진제로 알려져 있으며

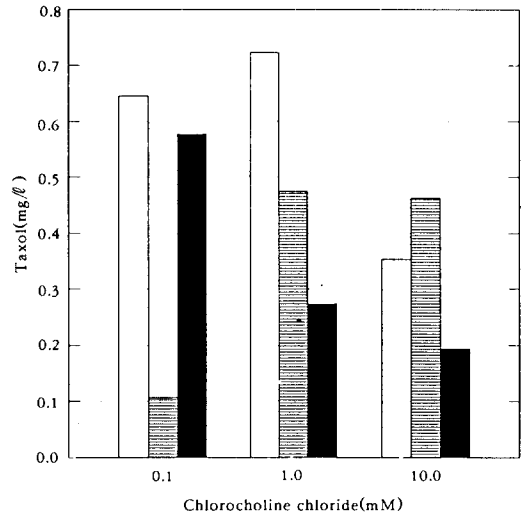


Fig. 3. Effect of chlorocholine chloride treatment at the 9th day(□), the 12th day(▨) and the 15th day(■) of culture.

*Catharanthus roseus*의 현탁세포배양에 첨가되었을 때 2차대사산물의 생산경향을 변화시킨 것으로 보고되었다(22). 여기서는 ABA, GA, ethephon, 5-azacytidine 및 식물세포배양에 있어서 생장조절제로 쓰이는 adenine, BAP, 2,4-D, 그리고 GA의 합성을 억제하는 물질인 ancymidol을 세포배양 도중에 첨가하여 taxol 생산에 미치는 영향을 살펴 보았다. 이들 생장조절제들 중에서 ethephon 처리시에만 taxol 생성이 증가하기는 했으나 0.2ppm 정도의 소량에 불과했고 다른 물질들은 taxol 생산에 별다른 효과를 보이지 않았다(Table 3).

Chlorocholine Chloride의 처리시기와 처리농도에 따른 Taxol 생산의 변화

*T. brevifolia*의 현탁세포배양에 있어서 taxol의 생산증대에 효과가 가장 컸던 chlorocholine chloride를 처리시기와 처리농도를 다르게 하여 그 영향을 살펴 보았다. Chlorocholine chloride를 세포접종 후 9일째, 12일째, 15일째에 각각 배지내 농도가 0.1 mM, 1mM, 10mM이 되도록 첨가하였다.

Chlorocholine chloride의 경우 세포를 접종한 지 9일째에 1mM을 첨가하는 것이 가장 효과가 좋았으며 이때 생성된 taxol의 양은 0.72mg/l 이었다 (Fig. 3).

요 약

Taxus brevifolia 현탁세포배양에서 항암제 taxol의 생산을 향상시키기 위해 5종류의 biotic elicitor와 5종류의 abiotic elicitor, 2종류의 대사억제제 및 8종류의 성장조절제를 세포배양 중에 첨가하여 효과가 있는 물질을 선별하였다. *T. brevifolia* 현탁세포배양의 대수증식기 말기인 10일째에 각각의 물질을 첨가하여 배양액 내의 taxol의 함량을 측정하고 결과 steroid계 억제제인 chlorocholine chloride를 처리하였을 때 taxol의 생성이 현저히 증가되었다. Chlorocholine chloride의 처리시기 및 처리농도를 다르게 하여 최적조건을 찾은 결과 9일째에 1mM을 첨가했을 경우 taxol 생성이 가장 좋았다.

감 사

본 연구는 1994년도 인하대학교 연구비 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. M. C. Wani, H. L. Taylor, M. E. Wall, P. Loggon and A. T. McPhail(1971), *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 2325.
2. G. A. Strobel, A. Stierle and F. J. G. M. van Kuijk(1992), *Plant Science*, **84**, 65.
3. S. B. Horwitz, L. Lothstein, J. J. Manfredi, W. Mellado, J. Parness, S. N. Roy, P. B. Schiff, L. Sorbara and R. Zegeb(1986), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **466**, 733.
4. J.-N. Deniss and A. E. Greene(1988), *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 5917.
5. K. C. Nicolaou, Z. Yang, J. J. Liu, H. Ueno, P. G. Nantermet, R. K. Guy, C. F. Clalborne, J. Renaud, E. A. Couladouros, K. Paulvannan and E. J. Sorensen(1994), *Nature*, **367**, 630.
6. A. Stierle, G. Strobel and D. Stierle(1993), *Science*, **260**, 214.
7. F. DiCosmo and M. Misawa(1985), *Trends Biotechnol.*, **3**(12), 318.
8. J. S. Rokem, J. Schwarzberg and I. Goldberg (1984), *Plant Cell Rep.*, **3**, 159.
9. N. P. Malpathak and S. B. David(1992), *Biotechnol. Lett.*, **14**(10), 965.
10. J. Chappell, R. Nable, P. Leming, R. A. Andersen and H. R. Burton(1987), *Phytochemistry*, **26**(8), 2259.
11. J. I. Smith, N. J. Smart, M. Misawa, W. G. W. Kurz, S. G. Tallevi and F. DiCosmo (1987), *Plant Cell Rep.*, **6**, 142.
12. D. R. Perrin and I. A. M. Cruichshank(1965), *Aust. J. Biol. Sci.*, **18**, 803.
13. N. T. Keen(1975), *Science*, **187**, 74.
14. D. J. Kim and H. N. Chang(1990), *Biotechnol. Lett.*, **12**(6), 443.
15. M. G. Hahn and P. Albersheim(1978), *Plant Physiol.*, **62**, 107.
16. M. F. Chaplin(1986), *Carbohydrate Analysis, a Practical Approach*(M. F. Chaplin and J. F. Kennedy, eds), 2, IRL press, Oxford.
17. S. Y. Byun and H. Pedersen(1994), *Biotechnol. Bioeng.*, **44**, 14.
18. D. N. Kuhn, J. Chappell, A. Boudet and K. Hahlbrock(1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A.*, **81**, 1102.
19. R. Phillips and G. G. Henshaw(1977), *J. Exp. Bot.*, **28**(105), 785.
20. J. I. Smith, N. J. Smart, W. G. W. Karz and M. Misawa(1987), *Planta Med.*, **53**(5), 470.
21. D. D. Songstad, K. L. Giles, J. Park, D. Novakovski, D. Epp, L. Friesen and I. Roewer (1989), *Plant Cell Rep.*, **8**, 463.
22. H.-A. Arfmann, W. Kohl and V. Wray (1985), *Z. Naturforsch.*, **40c**, 21.