

흡착제를 이용한 텍서스속 식물세포 배양액으로부터 Paclitaxel 회수

†김진현·홍승서
(주)삼양제넥스 생명공학연구소
(접수 : 2000. 7. 11., 게재승인 : 2000. 8. 17.)

Recovery of Paclitaxel from Suspension Culture Medium with Hydrophobic Resin

Jin-Hyun Kim† and Seung-Suh Hong
Samyang Genex Biotech Research Institute, Taejeon 305-348, Korea
(Received : 2000. 7. 11., Accepted : 2000. 8. 17.)

The soluble paclitaxel was found in the supernatant of the plant cell cultures of *Taxus chinensis*. The percentage of soluble paclitaxel depends on paclitaxel concentration in bioreactor. As paclitaxel concentration decreases, the percentage of soluble paclitaxel increases. It is therefore important to develop a new process for the recovery of soluble paclitaxel. The use of hydrophobic resin, HP20, gives nearly perfect recovery of paclitaxel in supernatant. The resin was more effective in treatment of the cell and debris free filtrate, probably because of the reduced solids content. In this case, 3 g/l resin and 1 day reaction were enough for recovery the soluble paclitaxel in medium.

Key Words : plant cell culture, hydrophobic resin, HP20, paclitaxel, recovery

서론

일반적으로, taxane 계열의 화합물들은 강력한 항종양 효과를 지니고 있으며, paclitaxel은 taxane고리를 가지는 화합물로서 최초로 알려져 있다(1). Paclitaxel은 백혈병과 암치료에 탁월한 효능을 나타내며 항종양 효과를 지니는 것으로 알려져 있는데, 미 국립 암센터 (NCI:National Cancer Institute)의 임상실험 결과에 따르면, 난소암 환자의 약 30% 이상, 유방암 환자의 약 50% 및 폐암 환자의 약 20% 정도를 치유하는 효과가 있다고 보고되어 있다(2). 또한 paclitaxel과 유사한 구조를 가진 baccatinIII, 10-deacetyl baccatinIII, 10-deacetyl taxol 및 cephalomannine은 taxane유도체들로 이들 중에는 반합성에 이용되는 중요한 전구체 및 항종양 효과를 지닌 것도 있다(3).

Paclitaxel은 식물계에서 독특한 천연화합물로서 구조가 복잡하여 현재로서는 화학적인 합성으로는 원활한 공급에 어려움이 따르고 있다. 따라서 원활한 paclitaxel의 공급을 위해 식물세포 배양과 생물 반응기 기술이 이용되고 있다. 즉, 주목나무의 조직 배양으로부터 paclitaxel을 생산, 획득하는 것이다. 이들 배양액에서 많은 양의 paclitaxel과 taxane

들을 포함하게 되는데 이러한 모든 paclitaxel을 식물세포 배양액으로부터 모두 회수하는 일은 매우 어려운 일이다. 특히 배양액으로부터 식물세포 및 세포조각 (debris)를 제거한 여액에 존재하는 paclitaxel의 회수에는 상당한 어려움이 따른다.

흡착제는 주로 발효과정에서 발생하는 저해생산물의 제거와 유독성물질과 소수성물질의 저장소로서 사용되어져 왔다. Robins과 Rhodes(1986)에 의하면 polymeric adsorbents를 이용하여 *Cinchona ledgeriana* 배양액으로부터 저해생산물을 제거하여 anthraquinone의 생산을 증대시켰다(4). Payne 등(1988)은 polymeric resin을 사용하여 *Catharanthus roseus* 배양액으로부터 저해생산물을 제거하여 indole alkaloid의 생산성을 향상시켰다(5). Buitelaar 등(1993)은 *Tagetes patula* 배양액에 XAD-7 흡착제를 첨가하여 저해생산물을 제거하여 thiophene 생산성을 향상시켰다(6). 이처럼 XAD-7과 같은 흡착제들은 수용액 상태에서 대체로 분자량이 작은 비극성 물질 (<Mw 1,000)의 흡착에 이용되어져 왔다. 흡착제(resin)를 선택함에 있어서 고려해야할 점은 우선 원하는 대사산물을 선택적으로 흡착하는 능력이 있고 다음으로 흡수능력, 재생가능성, 분해 및 마모성, 배지성분의 흡착정도, 독성, 가격 등이다. Solid sorbent는 주로 nonionic exchanger (Amberlite XAD-2,4,7,8,16), anion exchanger (Amberlite IRA-93, IRA-68, IRA-400, Dowex 1), cation exchanger (Amberlite IRC-50, 200, Dowex-50W) 등이 사용된다.

본 연구의 목적은 텍서스속 (*Taxus* genus) 식물세포 배양

†Corresponding Author : Samyang Genex Biotech Research Institute, 63-2 Hwaam-Dong, Yusung-Gu, Taejeon 305-348, Korea
Tel : 82-42-865-8392, Fax : 82-42-865-8399
E-mail : jhkim@genex.co.kr

액에 녹아 있는 항암활성을 갖는 성분인 paclitaxel을 효과적으로 회수함에 있다. 발효여액으로부터 paclitaxel 회수에는 여러가지 방법을 고려해 볼 수 있으나 가장 실용적인 방법이 흡착제에 의한 회수라 판단된다. 따라서 가장 효과적이고 경제적인 흡착제의 선택과 이를 이용한 paclitaxel 회수 조건을 최적화하여 식물세포 배양액에 녹아 있는 paclitaxel을 효과적으로 회수할 수 있는 방법을 검토하였다.

실험 및 방법

텍서스속 식물세포 배양 및 식물세포/세포조각 회수

본 연구에 사용된 배양액은 *Taxus chinensis* 의 잎으로부터 얻은 cell line을 이용하여 3000 l 발효조에서 배양한 배양액을 이용하였다(7). 배양액으로부터 식물세포는 데칸터(Westfalia, CA150 Clarifying Decanter)를 이용하여 회수하였으며, 데칸터 작업 24 시간 전에 100 g/l NaCl를 배양액에 첨가하여 회수되는 세포내의 수분함량을 최대한 줄였다. 배양액에 NaCl 첨가한 후에 교반은 계속하고 통기(aeration)는 중단하여 거품 생성은 최소화 하였다. 배양액은 실험도중에 계속해 교반하여 데칸터에 균일하게 공급하였다. 보울(bowl)의 회전은 6000 rpm이며 실험 도중에는 변화되지 않는다. 발효조에서 데칸터로의 식물세포 배양액 공급은 diaphragm 펌프를 이용하였다. 데칸터를 거쳐 나오는 여액중에 잔존하는 식물세포조각(debris)은 고속원심분리기를 이용하여 회수 하였다. 고속원심분리기(α -Laval, BTPX 205GD-35 CDEFP)의 회전은 9600 rpm이며 실험도중에는 변화되지 않는다. 고속원심분리기로의 여액 공급은 diaphragm 펌프를 이용하였다.

Paclitaxel 함량 분석

발효배양액과 여액 2 mL을 취하여 HPLC (Waters) 분석방법에 의하여 paclitaxel 함량을 분석하였으며 모든 sample은 3개씩 취하여 분석후 평균값을 취하였다(8). 채취한 sample 2 mL에 internal standard 용액 100 μ l(6.25 mg N-propyl paraben/5 mL methanol), CPC 용액 200 μ l (10 g cetyl pyridinium chloride/100 mL distilled water), methyl-t-butyl ether 2.5 mL를 첨가하고 overnight 교반하였다. 교반후 상등액을 취하여 amino propyl SPE cartridges (Alltech, Cat. #211025)를 통과시킨 후 methyl t-butyl ether/methanol (85/15, v/v) 용액 3 mL로 세척하고 여액을 건조한 후에 0.5 mL 메탄올에 녹여 분석하였다. 분석에 사용한 column은 Capcell Pack C18 UG 120 (250 mm X 4.6mm, Shiseido), column 온도는 40 $^{\circ}$ C, 이동상은 CH₃CN/Water (20-100% gradient), 유속은 1.0 mL/min, sample 주입량은 10 μ l 이며, UV (227 nm) detector를 사용하였다. Paclitaxel 표준물질은 Sigma 제품을 사용하였다.

실험재료

텍서스속 식물세포 배양여액 (paclitaxel 함량 = 4 mg/L)에 여러종류의 흡착제, AMBERLITE XAD-7과 XAD-4 (Rohm & Haas, USA), DIAION HP20 (Mitsubishi, Japan), C1 (Shiseido, Japan)를 첨가하고 상온에서 반응시켰다(shaking,

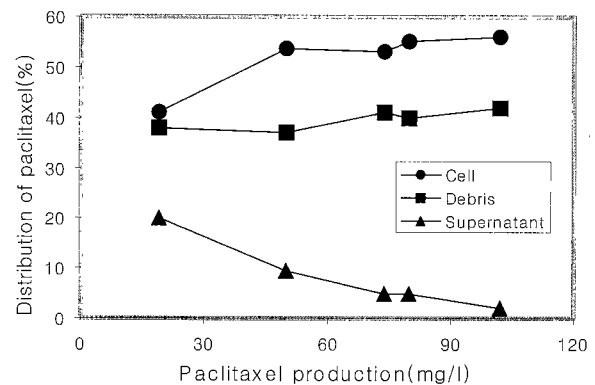


Figure 1. Correlation of paclitaxel production in bioreactor on distribution of paclitaxel.

overnight). Overnight시킨 후 여과하여 흡착제와 상등액을 분리하여 상등액에서의 잔존 paclitaxel양과 흡착제에 흡착된 paclitaxel양을 확인하였다. 사용된 흡착제는 모두 사용 전에 24시간 동안 메탄올에 담가둔 후에 동량의 증류수로 여러번 씻어주고 60 $^{\circ}$ C dry oven에서 건조한 후에 사용하였다. 흡착 후 메탄올을 이용하여(Resin:MeOH=1:1) 탈착하였다.

결과 및 고찰

배양액내 paclitaxel 분포

일반적으로 식물세포배양에 의해 생산되는 이차대사산물의 경우 대부분 물에 잘 녹지 않아 세포 또는 세포조각에 포함되어 있다(9). 텍서스속 식물세포인 *Taxus chinensis* 배양에 의한 paclitaxel 생산의 경우에도 생산된 paclitaxel은 대부분 식물세포나 세포조각에 포함되어 있으며 발효여액에 일부 녹아 있게 된다 (대략 7 mg/l 이하). 텍서스속 식물세포인 *Taxus chinensis* 배양액 내에서의 paclitaxel의 분포를 Figure 1에 나타내었다. Paclitaxel 생산량이 증가할수록 데칸터(식물세포 회수)와 고속원심분리기(식물세포조각, debris 회수)로부터 회수되는 paclitaxel은 증가하는 반면 여액에 잔존하는 paclitaxel량은 감소하였다. 따라서 배양액에 녹을 수 있는 paclitaxel의 농도에 한계(대략 7 mg/l 이하)가 있기 때문에 생산량이 증가할 수록 여액에 잔존하는 paclitaxel함량은 상대적으로 감소하게 된다. 특히 발효조에서의 생산량이 적을 경우 여액에 잔존하는 paclitaxel의 상대적인 양이 증가하므로 수율 증가 측면에서 이를 반드시 회수하여야 한다. 예를들면, 발효조에서의 paclitaxel 생산량이 20 mg/l인 경우 여액에 잔존하는 paclitaxel은 20% 정도로 상당히 많은 부분을 차지하게 된다. 이러한 상황에서 여액내 존재하는 paclitaxel 회수는 전체 수율 향상 측면에서도 반드시 이루어 져야 한다.

여액내 paclitaxel 회수

텍서스속 식물세포 발효여액, 식물세포와 세포조각이 제거된 여액 1 l에 여러가지 종류의 흡착제를 첨가하여 동일 첨가량에 대한 흡착 및 탈착 정도를 실험하여 Figure 2에 나타내었다. 그림에서 보는 바와 같이 XAD-7 (non ionic aliphatic acrylic polymer)과 HP20 (styrene, high porous polymer)

Table 1. Comparison of resins for recovery of soluble paclitaxel in supernatant.

Resin	Maker	Material	Size(m)	Surface area(m ² /g)	Price ^a
XAD-4	Rohm & Haas(USA)	Stylene	690-490	725	2.5
XAD-7	Rohm & Haas(USA)	Acrylic	840-250	450	1.5
HP20	Mitsubishi(Japan)	Stylene	>250	400-800	1.0
C1	Shiseido(Japan)	C1	149-74	140	6.5

^aRelative price in 1999

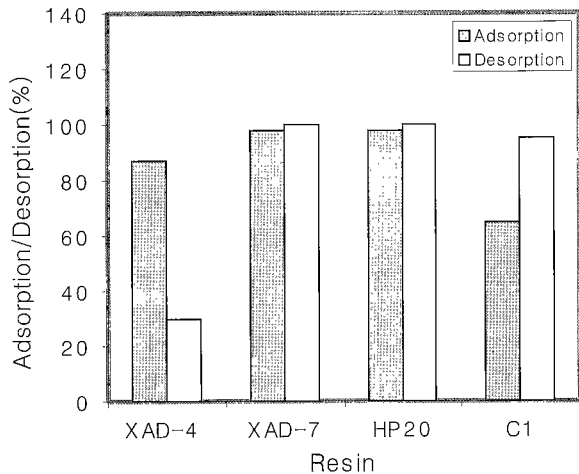


Figure 2. Effect of resin on adsorption and desorption of soluble paclitaxel in supernatant (Adsorption : resin 3 g/l, 1 day reaction at room temperature under shaking; Desorption : methanol extraction for 4 hours at room temperature under shaking).

의 경우 흡착 및 탈착이 매우 용이하여 다른 종류의 흡착제에 비하여 상당히 효과적임을 알 수 있었다. 반면 XAD-4의 경우에는 탈착효율이 낮은 문제가 있었다. Forche 등 (10)의 경우에도 *Thuja occidentalis* 배양액으로부터 XAD-4 흡착제를 이용한 terpenoid 회수시 탈착효율이 상당히 낮음을 보고 하였다. 일반적으로 XAD-7은 주로 배양액으로부터 저해생산물을 제거하여 원하는 물질의 생산량을 증가시키는 역할을 한다. 즉, XAD-7과 같은 흡착제들은 수용액 상태에서 대체로 분자량이 작은 비극성 물질 (<Mw 1,000)의 흡착에 이용되어져 왔다(4-5). 가격 측면에서는 Table 1에서 비교한 바와 같이 HP20이 더욱 경제적인임을 알 수 있으며, 따라서 흡착 및 탈착 효율이 좋고 가격 측면에서 경쟁력이 있는 HP20을 이용하여 여액내 paclitaxel 회수 실험을 수행하였다. HP20을 여러가지 농도로 첨가하여 흡착제 첨가량에 따른 발효배양액, 데칸터 여액, 고속원심분리기 여액 내의 paclitaxel 흡착 정도를 Figure 3에 나타내었다. 식물세포와 세포조각이 포함되어 있는 배양액의 경우 흡착효율이 상당히 떨어져 10 g/l 흡착제로 3일 동안 반응시켜도 여액내 paclitaxel은 여전히 잔존함을 알 수 있었다. 이는 세포와 세포조각이 여액에 존재하는 paclitaxel의 흡착을 방해하기 때문으로 판단된다. 데칸터 여액, 식물세포만 제거되고 세포조각은 포함되어 있는 여액의 경우에는 흡착효율이 향상되어 5 g/l 흡착제 처리로 1일 정도면 여액내 paclitaxel이 완전히 흡착되어 회수할 수 있음을 알 수 있었다. 또한 고속원심분리기 여액, 식물세포와 세

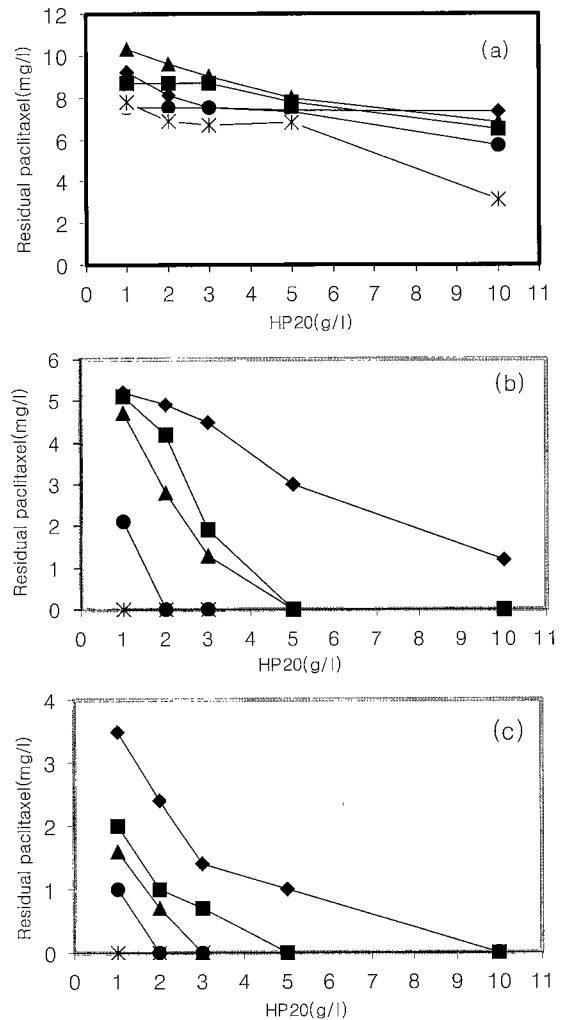


Figure 3. Effect of HP20 on adsorption and desorption of paclitaxel: (a)HP20 treatment of whole suspension, (b)HP20 treatment of decanter supernatant, and (c)HP20 treatment of high-speed centrifuge supernatant(◆ : 6hr , ■ : 17hr, ▲ : 24hr, ● : 48hr, and * : 72hr).

포조각이 제거된 여액의 경우 3 g/l 흡착제 처리로 1일 정도면 여액내 paclitaxel이 완전히 흡착되어 여액내 paclitaxel을 완전히 회수할 수 있었다. 이상의 결과로부터 여액에 녹아 있는 paclitaxel 회수를 위하여 식물세포와 세포조각을 미리 제거한 여액, 즉 고체 함량을 줄인 여액이 더욱 효과적임을 알 수 있었다. 발효배양액에 녹아 있는 paclitaxel 대량 회수의 경우 HP20 흡착제를 column에 충전하여 사용하면 효과적으로 배양액으로부터 paclitaxel을 연속적으로 회

수할 수 있었다. 결과적으로 식물세포 배양에 의한 paclitaxel 생산의 경우 배양액 내의 식물세포는 데칸터를 이용하여 회수하고 여액에 포함된 세포조각은 고속원심분리로 회수하며, 여액에 녹아있는 paclitaxel은 흡착제를 이용하여 회수하는 것이 바람직할 것으로 판단된다.

요 약

택서스속 식물세포인 *Taxus chinensis* 배양에서 식물세포, 세포조각 및 여액에 있는 paclitaxel 의 분포는 paclitaxel 생산량에 의존하였다. 즉, 여액에 녹을 수 있는 paclitaxel에 한계가 있기 때문에 발효조에서의 생산량이 적을 경우 여액에 녹아 있는 paclitaxel 양은 상대적으로 증가하여 수율 증가 측면에서 이를 반드시 회수하여야 한다. 여러가지 종류의 흡착제 중에서 HP20 (styrene, high porous polymer)의 경우 흡착 및 탈착 효율이 좋고 가격도 저렴하여 가장 경제적인 흡착제임을 알 수 있었다. 식물세포와 세포조각이 포함되어 있는 배양액의 경우 흡착효율이 상당히 떨어져 10 g/l 흡착제로 3일 동안 반응시켜도 여액내 paclitaxel은 여전히 잔존함을 알 수 있었다. 데칸터 여액, 식물세포만 제거된 배양액의 경우에는 흡착효율이 향상되어 5 g/l 흡착제 처리로 1일 정도면 배양액내 paclitaxel이 완전히 흡착됨을 알 수 있었다. 또한 고속원심분리기 여액, 식물세포와 세포조각이 제거된 여액의 경우 3 g/l 흡착제 처리로 1일 정도면 여액내 paclitaxel이 완전히 흡착되어 여액내 paclitaxel을 완전히 회수할 수 있었다. 이상의 결과로부터 여액에 녹아 있는 paclitaxel 회수를 위하여 식물세포와 세포조각을 미리 제거한 여액, 즉 고체 함량을 줄인 여액이 더욱 효과적임을 알 수 있었다.

REFERENCES

1. Wani, M.C., H. Taylor, M.E. Wall, P. Coggon, and A.T. McPhail (1971), Isolation of Taxol, A Novel Antileukemic Agent from *Taxus brevifolia*, J. Am.Chem.Soc., **93**, 2325-2326.
2. Rowinsky, E.K., L.A. Cazenave, and R.C. Donehower (1990), Review ; Taxol : A Novel Investigational Antimicrotubule Agent, J. of the National Cancer Institute, **82**, 1247-1257.
3. Kingston, D.G.I., G. Samaranyake, and C.A. Ivey (1990), The Chemistry of Taxol, A Clinically Useful Anticancer Agent, J. Nat. Products, **53**, 1-12.
4. Robins, R.J. and M.J.C. Rhodes (1986), The Stimulation of Anthraquinone Production by *Cinchona ledgeriana* Cultures with Polymeric Adsorbents, Appli. Microbiol. Biotechnol., **24**, 35-41.
5. Payne, G.F., N.N. Payne, M.L. Shuler, and M. Asada (1988), In Situ Adsorption for Enhanced Alkaloid Production by *Catharanthus roseus*, Biotechnol. Lett., **10**, 187-192.
6. Buitelaar, R.M., E.J.T.M. Leenen, G. Geurtsen, E. de Groot, and J. Tramper (1993), Effects of the addition of XAD-7 and of Elicitor Treatment on Growth, Thiophene Production, and Excretion by Hairy Roots of *Tagetes patula*, Enzyme Microb. Technol., **15**, 670-676.
7. Choi, H.K., T.L. Adams, R.W. Stahlhut, S.I. Kim, J.H. Yun, B.K. Song, J.H. Kim, S.S. Hong, and H.S. Lee (1999), Method for Mass Production of Taxol by Semi-Continuous Culture with *Taxus chinensis* Cell Culture, U.S. Patent, 5,871,979.
8. Hong, S.S., B.K. Song, J.H. Kim, C.B. Lim, H.S. Lee, K.W. Kim, I.S. Kang, and H.B. Park (1999), Method for Purifying Taxol from *Taxus* Biomass, U.S. Patent, 5,900,979.
9. Kim, D.J. and H.N. Chang (1990), Enhanced Shikonin Production from *Lithospermum erythrorhizon* by In Situ Extraction and Calcium Alginate Immobilization, Biotechnol. Bioeng., **36**, 460-466.
10. Forch, E., W. Schubert, W. Kohl, and G. Hofle (1984), Cell Culture of *Thuja occidentalis* with Continuous Extraction of Excreted Terpenoids, Proceedings, 3rd European Congr. Biotechnol., **1**, 189-192.

1. Wani, M.C., H. Taylor, M.E. Wall, P. Coggon, and A.T.