

## pH 조절에 의한 식물세포 및 세포조각 회수

†김진현·강인선·홍승서  
(주)삼양제넥스 생명공학연구소  
(접수 : 2000. 6. 30., 게재승인 : 2000. 8. 17.)

### Recovery of Plant Cell and Its Debris by pH Control

Jin-Hyun Kim†, In-Seon Kang, and Seung-Suh Hong  
Samyang Genex Biotech Research Institute, Taejeon 305-348, Korea  
(Received : 2000. 6. 30., Accepted : 2000. 8. 17.)

A novel recovery method was developed to obtain the plant cell and its debris from *Taxus chinensis* cell cultures. By pH control of plant cell cultures, plant cell and debris was precipitated. The best pH is between 1.8 and 2.2 to obtain the precipitate of the plant cell and debris. Also, paclitaxel is stable in this acidic conditions. This method is very simple and efficient to recover the plant cell and debris from plant cell cultures.

**Key Words** : paclitaxel, plant cell culture, recovery, pH control

#### 서론

최근 식물세포배양에 의한 항암제 paclitaxel (Taxol) 생산에 많은 관심을 가지게 되었다(1,2,3). 식물세포 배양에 의한 paclitaxel은 식물세포 (cell)와 cell lysis에 의하여 생성된 식물세포 조각(debris)에 대부분 분포되어 있으며 배지내에도 미량 존재하게 된다. 이러한 paclitaxel의 회수/추출/정제 공정에서의 첫번째 단계는 배양액으로부터 세포와 세포조각을 분리/회수하는 것이다. 이러한 분리/회수 공정에서는 식물세포 회수율의 최대화와 동시에 추출공정에서의 용매 사용량을 최소화하기 위해서 회수할 세포내의 수분함량을 최대한으로 줄여야 한다(4,5,6). 통상적으로 배양액으로부터 식물세포 회수 방법으로는 크게 두가지 방법, 즉 filter를 사용하는 방법과 원심분리를 사용하는 방법으로 생각할 수 있다. Bench scale (<15 l 배양)에서는 주로 coarse paper (filterpaper)를 이용하여 여과하는 방법으로 회수가 가능하다. 그러나 여과에 의한 세포 회수 방법은 미세한 세포조각 등에 의한 막힘 현상 때문에 scale-up에 많은 어려움이 따른다(7). 원심분리를 이용한 식물세포 회수시 식물세포와 세포조각을 회수하기 위하여 데칸터 (decanter)와 고속원심분리기 (high-speed centrifuge)를 연속적으로 사용하여야 하므로 많은 기술적 어려움과 투자비를 요구하게 된다는 단점이 있다. 특히 식물세포의 경우 미생물에

비하여 세포의 크기분포가 다양하며 (20-150  $\mu\text{m}$ ), 발효 배양액 내에 고형물인 세포의 비율이 높으며(>40%), 식물세포의 비중(<1.05)이 작기 때문에 원심분리를 이용한 회수에 많은 어려움이 따른다.

본 연구는 pH 조절에 의해 paclitaxel을 생산하는 식물세포의 배양액으로부터 식물세포와 세포조각을 고수율로 간단하고 경제적으로 회수 하는데 그 목적이 있다. 이러한 연구결과는 식물세포 배양액으로부터 식물세포 회수공정의 개선 자료로 이용 가능하다.

#### 재료 및 방법

##### 텍사스속 식물세포 배양

본 연구에 사용된 배양액은 *Taxus chinensis* 의 잎으로부터 얻은 cell line을 이용하여 3000 l 발효조에서 배양한 배양액을 이용하였다(8). 식물세포 배양후에 상온에서 배양액의 pH를 1N-HCl로 산성조건으로 만들어 주었다.

##### Paclitaxel 함량 분석

발효배양액과 여액 2 mL을 취하여 HPLC (Waters) 분석 방법에 의하여 paclitaxel 함량을 분석하였으며 모든 sample 은 3개씩 취하여 분석 후 평균값을 취하였다(9). 채취한 sample 2 mL에 internal standard 용액 100  $\mu\text{l}$  (6.25 mg N-propyl paraben /5 mL methanol), CPC 용액 200  $\mu\text{l}$  (10 g cetyl pyridinium chloride/100 mL distilled water), methylt-butyl ether 2.5 mL를 첨가하고 overnight 교반하였다. 교반 후 상등액을 취하여 amino propyl SPE cartridges (Alltech, Cat. #211025)를 통과시킨 후 methyl t-butyl ether/methanol

†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

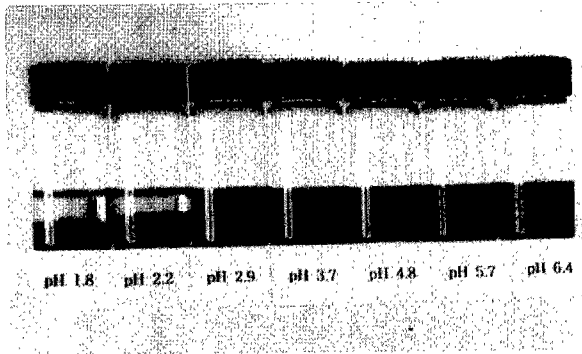


Figure 1. Effect of pH on precipitation of plant cell and debris.

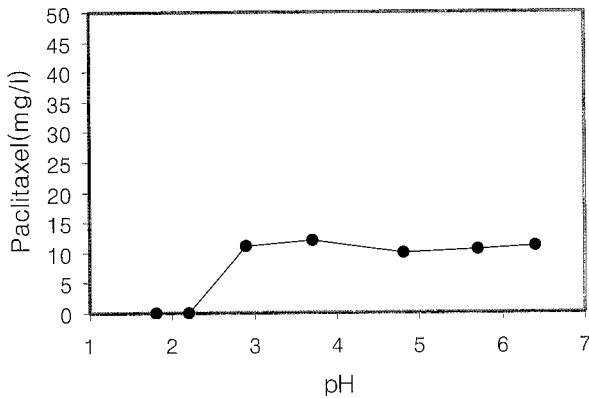


Figure 2. Effect of pH on paclitaxel content in supernatant after precipitation.

(85/15, v/v) 용액 3 mL로 세척하고 여액을 건조한 후에 0.5 mL methanol에 녹여 분석하였다. 분석에 사용한 column은 Capcell Pack C18 UG 120 (250 mm X 4.6 mm, Shiseido), column 온도는 40°C, 이동상은 CH<sub>3</sub>CN/Water (20-100% gradient), 유속은 1.0 mL/min, sample 주입량은 10 µl 이며, UV (227 nm) detector를 사용하였다. Paclitaxel 표준물질은 Sigma 제품을 사용하였다.

**결과 및 고찰**

Paclitaxel을 생산하는 *Taxus chinensis* 배양한 후 배양액의 pH는 6.2-6.4 정도이며 배양액 10 mL를 취하여 20 mL 유리병에 넣고, 1N-HCl 용액을 이용하여 배양액의 pH를 각각 1.8, 2.2, 2.9, 3.7, 4.8, 5.7 및 6.4로 조정하였다. Figure 1에서 보는 바와 같이 산성 조건인 pH 1.8과 2.2 에서 식물세포 및 세포조각들이 응집되어 효과적으로 침전이 생김을 확인할 수 있었다. pH가 낮을수록 식물세포 침전에 더욱 효과적이며, 식물세포 회수가 더욱 용이함을 알 수 있다. 또한 동일 pH 조건들 하에서 30분간 정제 시킨후 상등액 내의 paclitaxel 함량을 분석한 결과 Figure 2에서 보는 바와 같이 pH 1.8과 2.2 에서는 상등액에서 paclitaxel이 거의 확인되지 않아 세포와 세포조각들이 효과 적으로 회수될수 있음을 알 수 있었다. pH 2.9이상에서는 상등액내에 paclitaxel이 여전히 존재하여 침전 효과가 거의 없음을 알 수 있었다.

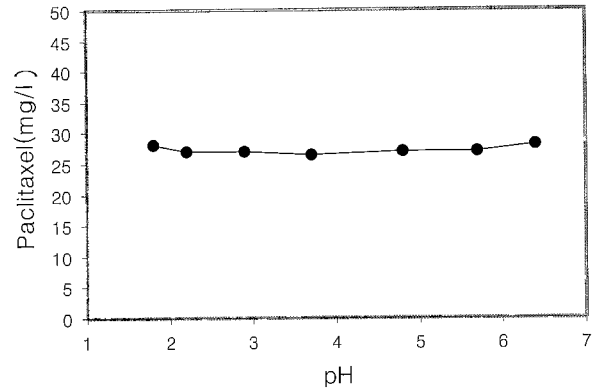


Figure 3. Effect of pH on stability of paclitaxel in plant cell and debris.

Paclitaxel 생산 식물세포 및 세포조각의 침전을 위한 pH 조건에서 paclitaxel의 안정성을 확인하기 위하여 동일 pH 조건들 (pH 1.8-6.2) 하에서 30분간 방치한 후에 paclitaxel 함량을 분석하였다. Figure 3에서 보는 바와 같이 세포 및 세포조각에 존재하는 paclitaxel이 전혀 분해되지 않음을 알 수 있었다. 따라서 paclitaxel을 생산하는 식물세포 배양액 으로부터 산성 조건 (pH 1.8 또는 2.2)에서 침전 및 회수된 세포와 세포조각내에 존재하는 paclitaxel은 안정함을 알 수 있었다. 이러한 결과는 산성 조건에서는 안정하나 알칼리 조건 (pH>9.0)에서는 paclitaxel이 분해된다는 보고와도 일치하는 결과이다(10). 이러한 연구결과는 paclitaxel 을 생산하는 식물세포 뿐만 아니라 다른 유용성분을 생산하는 식물세포 회수에도 응용이 가능할 것이다. 또한 단순히 배양액의 pH 조절에 의해 간단하면서도 경제적으로 식물세포를 및 세포조각들을 효율적으로 회수할 수 있다.

**요약**

Paclitaxel을 생산하는 *Taxus chinensis* 배양액의 pH를 산성 조건으로 조절하여 배양액으로부터 식물세포와 세포조각을 효과적으로 회수 할 수 있었다. 최적의 pH는 1.8 - 2.2 이며, 식물세포와 세포조각이 침전되는 것을 확인할 수 있었으며 침전후 상등액에서는 paclitaxel이 존재하지 않아 효과적인 회수가 가능함을 알 수 있었다. 또한 이러한 산성 조건에서 식물세포와 세포조각에 존재하는 paclitaxel 은 안정함을 알 수 있었다.

**REFERENCES**

1. Fett-Neto, A.G., W.Y. Zhang, and F. DiCosmo (1994), Kinetics of Taxol Production, Growth and Nutrient Uptake in Cell Suspensions of *Taxus cuspidata*, *Biotechnol. Bioeng.*, **44**, 205-210.
2. Strobel, G.A., A. Stierle, and F.J.G.M. Van Kuijk (1992), Factors Influencing the in vitro Production of Radiolabelled Taxol by Pacific Yew, *Taxus brevifolia*, *Plant Science*, **84**, 65-69.
3. Kingston, D.G.I., G. Samaranyake, and C.A. Ivey (1991), *The Chemistry of Taxol, A Clinically Useful Anticancer*

- Agent, *J. of Natural Products*, **53**, 1-12.
4. Rao, K.V. (1992), Taxol and Related Taxanes. I. Taxanes of *Taxus brevifolia* Bark, *Pharmaceutical Research*, **10**, 521-524.
  5. Witherup, E.M., S.A. Look, M.W. Stasko, T.J. Ghiorzi, and G.M. Muschik (1990), *Taxus* spp. Needles Contain amounts of Taxol Comparable to the Bark of *Taxus brevifolia* : Analysis and Isolation, *J. of Natural Products*, **53**, 1249-1255.
  6. Rao, K.V., J.B. Hanuman, C. Alvarez, M. Stoy, J. Juchum, R.M. Davies, and R. Baxley (1995), A New Large-Scale Process for Taxol and related taxanes from *Taxus brevifolia*, *Pharmaceutical Research*, **12**, 1003-1010.
  7. McGregor, W.C. (1986), Membrane Separations in Biotechnology, 1st ed., p.61, Dekker, New York.
  8. 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.
  9. 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.
  10. Georg, G.I., T.T. Chen, I. Ojima and D.M. Vyas (1995), *Taxane Anticancer Agents*, 1<sup>st</sup> ed., p.203, American Chemical Society, Washington.