

주목 세포배양에 의한 Taxol 생산: 2. 당농도의 영향

김진훈·박인석·윤정환·황용순·*변상요·김동일

인하대학교 공과대학 생물공학과, *아주대학교 공과대학 생물공학과

Taxol Production in *Taxus* Cell Cultures: 2. Effects of Sugar Concentration

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

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

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

ABSTRACT

The effects of sucrose on cell growth and anticancer drug taxol production were investigated in cell suspension cultures of *Taxus cuspidata*. The cells were cultured at various concentrations of sucrose (20 to 100 g/l). The highest specific growth rate was achieved at 40 g/l of sucrose as 0.076 day^{-1} and the highest final cell density, 34 g DCW/l after 25 days of culture, was obtained at 60 g/l of sucrose. The cell yield ($Y_{x/s}$) was found to be 0.55 g cell/g sucrose and doubling time (T_d) was 9.12 day. High concentration of sucrose (80, 100 g/l) and the addition of osmoticum enhanced the production of taxol significantly. The maximum taxol production was 1.36 mg/l at 80 g/l of sucrose, which was 0.01% as a specific content.

서론

Taxol은 태평양 주목(Pacific yew)인 *Taxus brevifolia*의 수피로부터 처음 분리된 macrocyclic diterpene alkaloid로서 최근 항암제로 각광받고 있다. Taxol은 taxane diterpenoid의 한 종류로서 oxentane ring 구조의 13번 탄소에 변형된 phenylalanine ester side chain의 흔히 볼 수 없는 특이한 구조를 가지는 것으로 밝혀졌다(1). 주목에는 taxol 이외에도 유도체인 10-deacetyl baccatin III, baccatin III, 10-deacetyl taxol, cephalomannine, 7-epi-10-deacetyl taxol 등이 함유되어 있다(2). Taxol은 암을 치료하는 탁월한 효능뿐 아니라 독특한 작용기작 때문에 많은 사람들의 관심을 모아 왔다. Vinblastin, vincristine과 같은 기존의 항암제들

이 microtubule의 형성과정을 방해하는 반면에, taxol은 세포의 분열 과정 중에 안정된 microtubule을 형성하여 tubulin의 재생을 막음으로써 세포분열을 저해한다(3, 4). 이러한 작용기작을 갖는 taxol은 처음에는 주로 leukemia 시스템에 대한 억제작용에 대해 연구되었으나 그 후 유방암, 난소암 등에도 탁월한 효과가 있음이 입증되었고 최근에는 미국 FDA(Food and Drug Administration)에 의해 난소암 치료제로 허가를 받아 Bristol Myer Squibb사에 의해 판매되고 있다(5, 6).

이러한 taxol의 개발과 생산에 있어서 가장 큰 어려움은 공급문제이다. 태평양 주목나무는 성장속도가 느린 편이며 taxol 함유량도 0.01~0.02%로 매우 낮기 때문에 한 명의 암 환자를 치료하기 위해서는 100년산 주목 3~6 그루가 필요하다. 더욱이 나

무의 수피를 모아 추출하므로 나무의 재생장은 기대할 수 없고 난소암 치료와 기타 암 치료를 위한 임상 시험을 위해서는 결국 수천 그루의 주목나무가 벌채되어야만 한다. 현재 주목들은 제한된 지역에서 군락을 형성하며 재생하기 때문에 주목 단지의 파괴에 의한 생태계의 변화도 큰 문제로 제기되고 있으며 미국의 여러 환경단체에서는 주목의 난벌에 대한 환경과피조사를 시작하였으며 생태계 보호를 위한 대책을 호소하고 있는 실정이다(7).

그래서 공급의 부족과 생태계 파괴문제를 모두 해결하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다. 직접적으로 나무로부터 추출하지 않고 taxol을 생산하는 방법으로는 크게 세 가지를 들 수 있는데 그중 하나는 화학적 합성 혹은 반합성이고, 다른 하나는 taxol을 생산하는 미생물을 이용하는 방법이고, 마지막으로 식물세포 배양을 통한 생산이 그것이다. 화학적 합성을 통한 방법은 최근에 성공 사례가 몇몇 발표되고 있으나(6, 8), taxol이 크고 복잡한 구조를 가지고 있어서 합성하는데 30여 단계를 거쳐야 하므로 상업화를 기대하기는 아직 어렵다. 10-deacetyl baccatin III를 통한 반합성 방법(7)도 연구되고 있으나 정제된 전구물질의 대량 생산 자체가 어려운 실정이다. 미생물을 이용한 taxol 생산은 Sterile(9) 등에 의해서 보고되었는데, 주목에 기생하는 곰팡이인 *Taxomyces andreanae*로부터 taxol을 생산하는 방법이다. 그러나 그 생산량이 24~50 ng/ℓ로 당분간 상업화하기에는 힘든 상황이다. 또 하나 기대되고 있는 방법이 식물세포 배양을 통한 생산이라 하겠다. 주목 세포배양에서는 이미 나무껍질에서와 근사한 함량(약 0.02%)의 taxol이 생산되는 것으로 보고되었으며(10), Christen 등(11)에 의하면 주목 세포배양을 통해 약 2 mg/ℓ의 taxol이 생산되었다고 하며, Bringi와 Kadkade(12)는 *Taxus chinensis*의 세포배양을 통해 150 mg/ℓ 이상의 taxol을 생산하였다고 보고하였다. 이러한 여러 가지 상황을 고려할 때 주목 세포배양을 통한 상업화 가능성은 상당히 높다고 하겠다.

식물세포배양을 통한 이차대사산물의 생산을 증대시키기 위해서는 여러 가지 요소들이 연구되고 있다. 그중 자당(sucrose)은 세포성장뿐만 아니라 이차대사산물의 생산에도 영향을 미치는 중요한 요소라 할 수 있다. 일반적으로 초기 당농도의 증가는 이차대사산물의 생산을 증대시키는 것으로 알려져 있다(13). 보고에 따르면, 초기 당농도의 증가는 *Lithospermum erythrorhizon*과 *Dioscorea deltoidea*

에서 각각 shikonin과 diosgenin 생산에 좋은 효과를 보였다고 한다(14, 15). 그밖에도 *Daucus carota*의 callus배양에서 3% sucrose와 5% mannitol을 함께 처리하여 anthocyanin 생산을 증대시킨 보고도 있다(16). 그러나 제한된 범위 이상의 당농도에서는 생화학적 경로의 억제 및 osmotic shock에 의해 세포 성장과 alkaloid 생산이 억제된다.

본 연구는 이미 발표된 주목 세포주 유도에 관한 연구(17)에서 얻은 현탁세포를 사용하여 여러 가지 인자들이 taxol 생산에 미치는 영향을 조사한 일련의 연구중의 하나이다. 여기서는 배지 성분의 기본이 되는 자당의 영향을 보기 위하여, 초기 당농도를 변화하여 배양시간에 따른 *Taxus cuspidata*의 세포 성장과 taxol 생산의 변화를 살펴 보고, 자당 첨가에 따른 삼투압 증대가 taxol 생산에 미치는 영향을 보기 위해 탄소원으로 사용되지 않는 osmoticum을 첨가, 비교하여 봄으로써 초기 당농도 변화에 따른 taxol 생산 변화의 원인을 알아 보고, 궁극적으로 taxol 생산을 증대시킬 수 있는 최적의 조건을 찾아 하였다.

재료 및 방법

세포배양 및 배지

주목 세포는 우리 나라에 가장 많이 서식하고 있는 주목나무인 *Taxus cuspidata*로부터 얻었다(17). 현탁세포배양을 위해서는 기본 배지로 Schenk and Hilderbrant (SH)배지에 α -naphthaleneacetic acid (NAA) 5 mg/ℓ, 6-benzylaminopurine (BAP) 0.2 mg/ℓ, vitamin stock solution을 첨가하였고 탄소원으로는 자당을 20 g/ℓ 첨가하였다. 배지의 pH는 증기멸균하기 전에 1 M NaOH를 첨가하여 5.8을 맞춰 주었다. 모든 실험은 500ml Erlenmeyer flask에 배지 200 ml을 넣어 수행하였으며, 암 조건 하에서 25°C, 150 rpm을 유지하였다.

세포중량 측정

세포중량 결정을 위해서는 세포생체중량(Fresh weight, FW)과 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 측정한 후에 60°C dry oven에서 항량이 되도록 건조하여 DCW를 측정하

였다.

Taxol 및 당분석

용매를 이용한 추출방법은 Wani 등이 기술한 방법을 수정하여 사용하였다(1). 각 시료에서 세포와 배지를 포함한 전체 배양액과 동량의 CH_2Cl_2 를 첨가한 후 1시간 동안 초음파 분쇄하였다. 상 분리 후에 CH_2Cl_2 층에서 10 ml을 취하여 진공을 걸어 용매를 증발시킨 후 시료를 HPLC-grade MeOH에 다시 녹이고 $0.45 \mu\text{m}$ filter를 이용하여 불순물을 걸러내었다. HPLC는 영인 HPLC system에 reversed-phase column(Curosil-G, $6 \mu\text{m}$, $250 \times 4.6 \text{mm}$, Phenomenex, USA)을 사용하였다. 전개 용매의 조성은 MeCN: H_2O 가 40:60이 되도록 하였고 isocratic 조건에서 분석하였다. 용매의 유속은 1.5 ml/min 으로 하였고 227 nm 에서 UV 흡광도를 측정하였다. 배지내의 총당 분석은 phenol sulfuric acid 법을 사용하였다(18).

결과 및 고찰

당농도가 주목 현탁배양세포의 성장에 미치는 영향

Drapeau 등(19)에 의하면 자당농도는 *D. deltoidea*의 세포생장과 세포생체중량과 세포건조중량과의 비(FW/DCW)에 크게 영향을 미친다고 하였다. 그러나 Battat 등(20)은 *D. deltoidea* 세포배양에서 200 g/l 의 자당 첨가까지 세포성장속도의 변화가 없었다고 보고한 바 있다. *T. cuspidata*의 경우에는 어떠한 경향을 따르는가를 알아보기 위해 SH배지에 자당의 첨가량을 변화시켜 배양하였으며 이때 시간에 따른 세포생장을 Fig. 1에, 그에 따른 자당 소비를 Fig. 2에 나타내었다. 자당농도가 60 g/l 일 때까지는 자당농도가 증가함에 따라 세포건조중량도 함께 증가하였으며 최대 세포농도에 도달하는 시간도 증가하였다. 가장 좋은 비성장속도는 자당농도가 40 g/l 일 때로 비성장속도는 0.076 day^{-1} 였고, 가장 높은 세포농도는 60 g/l 에서 얻었으며 이때의 농도는 25일 배양 후로 34 g DCW/l 였다. 당농도 대비 세포수율($Y_{s/s}$)은 $0.55 \text{ g cell/g sucrose}$ 였고 배가 시간(T_d)은 9.12 day 였다. 고농도의 자당($80, 100 \text{ g/l}$)에서는 세포생장이 상당히 저해를 받았다. 고농도에서의 세포생장 저해에 대한 보고는 이미 발표된 바 있으나, 그에 반대되는 발표도 보고된 것으로 보아 일정한 규칙이 있는 것은 아니라고 생각된다(19,

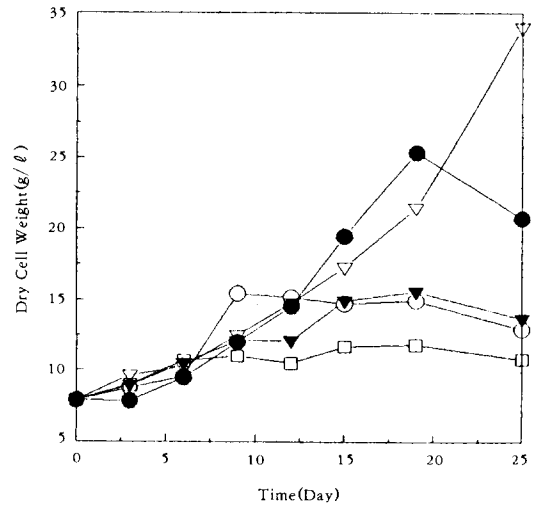


Fig. 1. Time course changes of cell growth at various sucrose concentrations(\circ , 20 g/l ; \bullet , 40 g/l ; ∇ , 60 g/l ; \blacktriangledown , 80 g/l ; \square , 100 g/l sucrose)

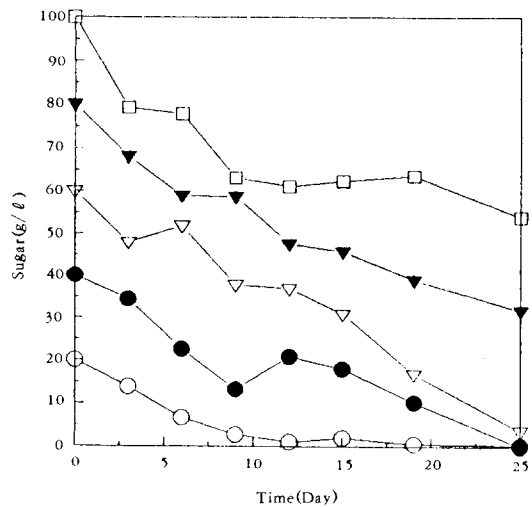


Fig. 2. Sugar consumption profiles during the culture(\circ , 20 g/l ; \bullet , 40 g/l ; ∇ , 60 g/l ; \blacktriangledown , 80 g/l ; \square , 100 g/l sucrose)

20, 21). 60 g/l 이하로 자당이 첨가되었을 때는 배양 후에 당이 모두 소모되었으나, 80 g/l 이상의 자당 첨가시에는 배양 후에 상당량의 당이 남아 있

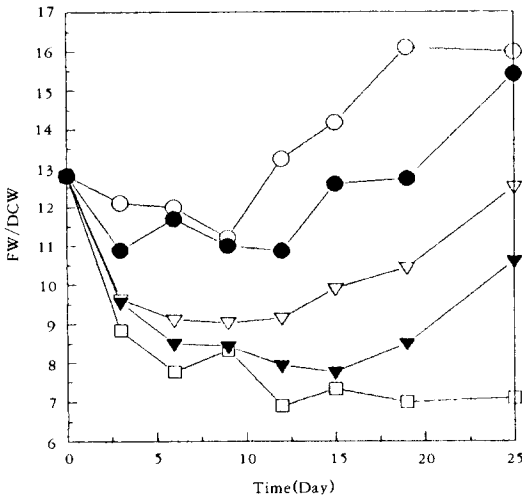


Fig. 3. Time course changes of FW/DCW ratio at various sucrose concentrations(○, 20 g/l; ●, 40 g/l; ▽, 60 g/l; ▼, 80 g/l; □, 100 g/l sucrose)

었다. FW/DCW 비는 식물세포배양에서 이차대사 산물을 생산할 때 중요한 공정변수로 사용할 수 있는데 그 이유는 이것이 당농도의 변화에 따른 세포의 상태를 나타내기 때문이다(22). Fig. 3에 나타난 것과 같이 초기 당농도가 증가함에 따라 FW/DCW 비가 감소하였다. 이것은 고농도의 당에 의해 세포가 더욱 조밀해졌음을 의미한다. 일반적으로 처음에는 FW/DCW 비가 감소하다가 대수증식기에는 일정한 값을 유지하고 정지기에는 급격히 증가하는 것이 보통이며 본 실험 결과는 이러한 경향에 어느 정도 일치하였다.

당농도가 주목 세포배양에 의한 Taxol 생산에 미치는 영향

식물세포배양에 의한 이차대사산물의 생산에 있어서 고농도의 자당을 첨가함으로써 생산이 증가된 사례는 이미 널리 알려져 있다. Panda 등(23)에 의하면 *Holarrhena antydidysenterica*의 현탁배양에서 고농도의 자당 첨가시에 alkaloid 생산이 증가되었다고 하였다. 그외에도 Rajen-dran 등(16)은 *Daucus carota*의 callus 배양에서의 anthocyanin 생산에, Su와 Humphery 등(24)은 *Anchusa officinalis*의 perfusion culture에 의한 rosmarinic acid 생산에, 그리고 Yun 등(25)은 *Daucus carota*의 현탁배양에

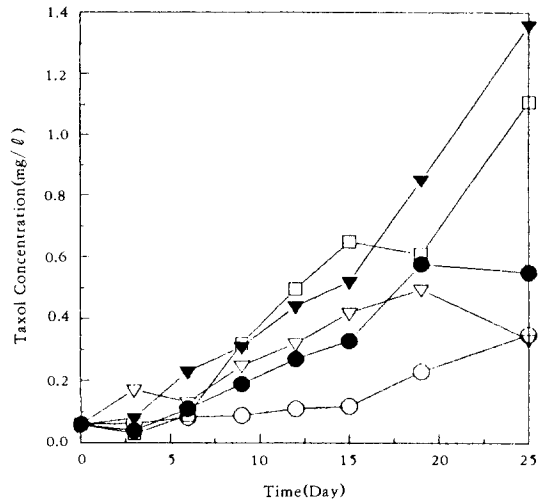


Fig. 4. Batch profiles of taxol production at various sucrose concentrations(○, 20 g/l; ●, 40 g/l; ▽, 60 g/l; ▼, 80 g/l; □, 100 g/l sucrose)

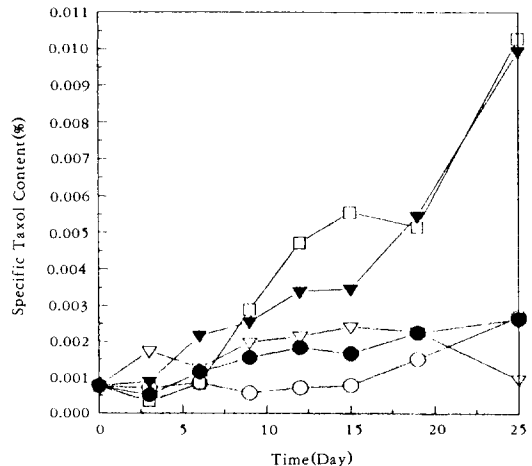


Fig. 5. Profiles of specific taxol content at various sucrose concentrations(○, 20 g/l; ●, 40 g/l; ▽, 60 g/l; ▼, 80 g/l; □, 100 g/l sucrose)

의한 carotenoid 생산에 있어서 고농도 자당 첨가시에 생산이 증대된 보고를 하였다. 여기서는 *T. cuspidata* 세포배양에서 초기 당농도의 변화가 taxol 생산에 어떠한 영향을 미치는가를 살펴 보았다. 20,

40, 60, 80, 100 g/l 자당농도에서의 단위 부피당 taxol 생산량을 Fig. 4에, 단위 세포건조중량당 taxol 생산량을 Fig. 5에 각각 나타내었다. 자당농도가 증가함에 따라, 그리고 배양기간이 지남에 따라 taxol 생산량도 증가함을 볼 수 있다. 고농도의 자당(80, 100 g/l)에서는 taxol 양이 15일 이후에 현저하게 증가함을 보였다. *Catharanthus roseus*의 경우(13)에는 8% 자당이 alkaloid 생산에 최적 조건이었는데 본 실험에서도 taxol 생산에 있어서 유사한 결과를 보였다. 초기 당농도의 증가는 배지 내의 삼투압을 증가시킨다. 이차대사산물의 합성에 대한 삼투압의 역할은 아직 확실히 밝혀져 있지 않지만 상당한 관련성이 있다고 할 수 있겠다.

결론적으로, 100 g/l의 자당 첨가시에 세포생장이 매우 저해됨을 볼 수 있었고, 그에 따라 단위 세포건조중량당 taxol 생산량은 80 g/l 자당 첨가시와 비슷하였으나, 단위 부피당 taxol 생산량은 25일 배양 후에, 80 g/l의 자당 첨가시에 가장 많았다. 이때의 단위 부피당 taxol 생산량은 1.36 mg/l로, 단위 세포건조중량당 taxol 생산량으로 환산하면 0.01% 이다.

여러 가지 Osmoticum이 Taxol 생산에 미치는 영향

고농도의 자당 첨가시에 이차대사산물의 생산 증대는 삼투압 증가와 관련지을 수 있다. 그러나 Chandler와 Dodds(26)에 의하면 고농도의 자당 첨가시에는 phenolics와 solasodine의 생산 증대가 세포의 성장속도 감소로 인하여 고농도의 탄소화물이 이차대사산물의 생산에 쓰였다고 한다. 이러한 현상에 대해 보다 확실한 결과를 얻기 위하여 탄소원으로는 사용되지 않으면서 삼투압만을 증가시킬 수 있는 mannitol을 처리하여 보았다. 이때 단위 부피당 taxol 생산량을 Fig. 6에 그리고 단위 세포건조중량당 taxol 생산량을 Fig. 7에 각각 나타내었다. 2%의 자당과 6%의 mannitol을 첨가한 경우와 8% mannitol만을 첨가한 경우에 있어서, 전자는 탄소원으로 사용할 수 있는 자당이 첨가된 데 반해 후자는 탄소원으로 사용할 탄소원이 첨가되지 않았다. 7일간 배양했을 경우 taxol의 생산은 거의 이루어지지 않았다. 14일간 배양했을 경우에 8% 자당이 포함된 SH 배지, 8% 자당 수용액에서 배양한 경우와 2% sucrose와 6% mannitol을 동시에 첨가한 배지에서 배양한 경우에는 모두 0.3 mg/l 이상의 taxol이 생산되었으며, 이를 단위 세포건조중량당 taxol 생

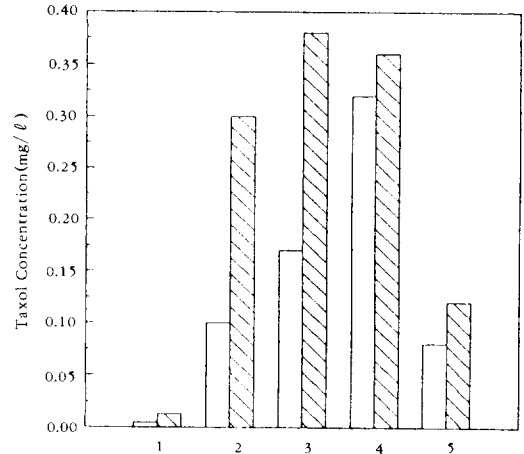


Fig. 6. Effects of various osmoticum on taxol production for 7 days(□) and 14 days(▨) in *Taxus cuspidata* suspensions: 1. control; 2. 8% sucrose+SH medium; 3. 8% sucrose solution; 4. control+6% mannitol; 5. 8% mannitol+SH medium.

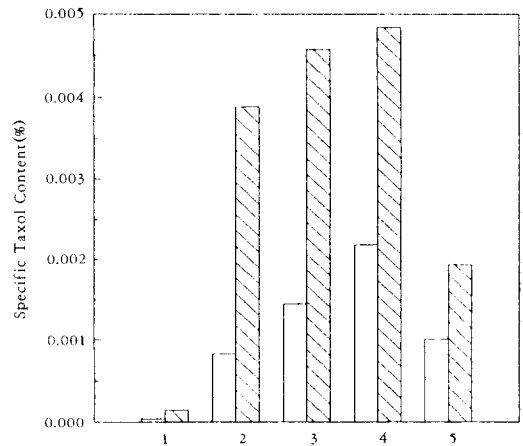


Fig. 7. Effects of various osmoticum on specific taxol content for 7 days(□) and 14 days(▨) in *Taxus cuspidata* suspensions: 1. control; 2. 8% sucrose+SH medium; 3. 8% sucrose solution; 4. control+6% mannitol; 5. 8% mannitol+SH medium.

산량으로 환산하면 Fig. 7에서 보는 바와 같이 약 0.0038% 이상이 되었다. 이러한 결과로 볼 때 taxol의 생산에 있어서 배지 내의 삼투압의 조절이

중요하며, 기본 대사에 필요한 탄소원도 함께 필요함을 알 수 있었다.

요 약

Taxus cuspidata 현탁배양에서 세포생장과 항암제 taxol의 생산에 있어서 당의 영향을 살펴 보기 위하여 여러 농도에서 세포배양을 하였다. 40 g/l의 자당이 첨가하였을 때 비생장속도는 0.076 day⁻¹로 최대였으며, 60 g/l의 자당이 첨가되었을 때에는 25일 배양 후 최고 세포 농도인 34 g DCW/l를 나타내었다. 이때 당 소모 대비 세포수율($Y_{x/s}$)은 0.55 g cell/g sucrose였고, 배가시간(T_d)은 9.12 day였다. Taxol의 생산은 80 g/l 이상의 높은 당농도 첨가시와 당 및 osmoticum의 동시 처리시에 현저히 증대되었다. Taxol의 최대생산은 80 g/l 자당 첨가시로 1.36 mg/l였으며 이것을 단위 세포건조중량당으로 계산하면 0.01%이었다.

감 사

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

참 고 문 헌

- M. C. Wani, H. I. Taylor, M. E. Wall, P. Coggon and A. T. McPhail (1971), *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 2325.
- S. L. Richheimer, D. M. Tinnermeier and D. W. Timmons (1992), *Analytical Chemistry*, **64**(20), 2323.
- P. B. Schiff, J. Fant and S. B. Horwitz (1979), *Nature*, **277**, 665.
- J. Parness and S. B. Horwitz (1981), *J. Cell Biol.*, **91**, 479.
- J. P. Denis, A. E. Green, D. Guenard, F. Gueritte-Voegelien, L. Mangatal and P. Potier (1988), *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 5917.
- S. Borman (1994), *Chem. Eng. News*, **72**(8), 32.
- S. Borman (1991), *Chem. Eng. News*, **69**(35), 11.
- K. C. Nicolaou, Z. Yang, J. J. Liu, H. Ueno, P. G. Nantemet, R. K. Guy, C. F. Clalborne, J. Renaud, E. A. Couladouros, K. Paulvannan and E. J. Sorensen (1994), *Nature*, **367**, 360.
- A. Stierle, G. Strobel and D. Stierle (1993), *Science*, **260**, 154.
- A. G. Fett-Neto, F. DiCosmo, W. F. Reynolds and K. Sakata (1992), *Bio/Technology*, **10**, 1572.
- A. A. Christen, D. M. Gibson and J. Bland (1991), U. S. Patent 5,019,504.
- V. Bringi and P. Kadkade (1993), WO. Patent 9,317, 121.
- K-H. Knobloch and J. Berlin (1980), *Z. Naturforsch.*, **35c**, 551.
- Y. Fujita, Y. Hara, T. Ogino and C. Suga (1981), *Plant Cell Rep.*, **1**, 59.
- B. Tal, J. Gressel and I. Goldberg (1982), *Planta Med.*, **44**, 111.
- L. Rajendran, G. A. Ravishankar, L. V. Venkataraman and K. R. Pranthiba (1992), *Biotechnol. Lett.*, **14**, 707.
- 강인선, 전정욱, 반승연, 김승보, 변상요, 김동일, 정현관 (1994), *한국생물공학회지*, **9**, 299.
- M. F. Chaplin (1986), In *Carbohydrate analysis*(M. F. Chaplin and J. F. Kennedy, eds) IRL press, Oxford.
- D. Drapeau, H. W. Blanch and C. R. Wilke (1986), *Biotechnol. Bioeng.*, **28**, 1555.
- E. Battat, J. Rokem and I. Goldberg (1989), *Plant Cell Rep.*, **7**, 652.
- H. Mizukami, M. Konoshima and M. Tobata (1977), *Phytochemistry*, **16**, 1183.
- I-S. Park and D-I. Kim (1993), *Biotechnol. Tech.*, **7**, 626.
- A. K. Panda, S. Mishra and V. S. Bisaria (1992), *Biotechnol. Bioeng.*, **39**, 1043.
- W. W. Su and A. E. Humphrey (1990), *Biotechnol. Lett.*, **11**, 793.
- J. W. Yun, J. H. Kim and Y. J. Yoo (1990), *Biotechnol. Lett.*, **12**, 905.
- S. F. Chandler and J. H. Dodds (1983), *Plant Cell Rep.*, **2**, 205.

- Biotechnol. Lett.*, **11**, 793.
25. J. W. Yun, J. H. Kim and Y. J. Yoo (1990),
Biotechnol. Lett., **12**, 905.
26. S. F. Chandler and J. H. Dodds (1983), *Plant
Cell Rep.*, **2**, 205.