

## 양귀비 세포 현탁배양계에서 Cyclodextrin을 이용한 Benzophenanthridine alkaloids의 생산성 증대

박 세 춘 † 조 규 현  
강원대학교 공과대학 화학공학과

### Production Enhancement of Benzophenanthridine alkaloids in the Suspension Cultures of California poppy using Cyclodextrin

Se Chun Park and Gyu Heon Cho<sup>†</sup>

Dept. of Chemical Engineering, College of Engineering, Kangwon National University,  
Chuncheon, Kangwon 200-701, Korea

#### ABSTRACT

In this research, an extractive production system for alkaloids, where production and some degree of separation occur simultaneously, was developed in a way that the fast removal of alkaloid produced from the suspension cultures was done by capturing alkaloid with cyclodextrins. The alkaloid production was substantially enhanced up to 40 fold when the solid cultures of *E. californica* cells treated with  $\beta$ -cyclodextrin compared to the control. The enhancement of alkaloid production was also observed in the suspension cultures. Interestingly, the production pattern seemed to change when the cultures were treated with  $\beta$ -cyclodextrin so that the major part of the alkaloids in the treated cultures was present in the medium, while the non-treated cultures produced the alkaloids intracellularly.  $\beta$ -cyclodextrin was the most effective one in terms of the alkaloid production among the cyclodextrins ( $\alpha$ -cyclodextrin,  $\beta$ -cyclodextrin and  $\gamma$ -cyclodextrin) tested in the suspension cultures.  $\beta$ -cyclodextrin showed no adverse effect on the cell growth. The most effective concentration of  $\beta$ -cyclodextrin was observed around 1.5 % (w/v) in the suspension cultures. The formation of the inclusion complex of the alkaloids with  $\beta$ -cyclodextrin in the suspension cultures was confirmed by detecting the shift of UV absorbance from 274 nm to 282 nm with a UV spectrophotometer.

#### 서 론

많은 의약품, 고급 향료 및 천연 염색료 등과 같은 고가의 화학 물질은 주로 식물에서 추출되어 사용된다. 새로운 신약의 개발은 주로 식물의 2차 대사물질을 대상으로 하고 있으며, 실제 항암제 및 AIDS

치료제가 될 가능성이 높은 성분들이 식물 추출물에서 발견되고 있다. 최근 식물 조직배양 기술이 발달함에 따라, 이러한 유용식물 2차 대사물질들을 미분화 식물세포를 이용하여 생물 반응기 내에서 생산하려는 연구가 활발히 진행되고 있다.

대부분의 식물세포 2차 대사물은 농도가 매우 낮은 상태로 세포내에 축적되거나 세포외로 배출되게 되며, 어떠한 것들은 수용액상에서 용해도가 매우

† Corresponding Author

낮아 생산수율이 낮은 것이 문제이며, 또한 그 대사에 있어서, 최종 생성물이 아닌 중간체로 존재하는 경우가 많이 있다. 따라서 우리가 관심있는 식물세포 2차 대사물질은 세포 밖으로 배출되는 과정에서 분해(Degradation) 또는 다른 대사물질로 전환(Further Metabolism)될 가능성이 많다. 생산되는 농도가 매우 낮으므로 인해서 2차 대사물질의 분리공정이 매우 까다로울 뿐 아니라 상업화를 전제로 했을 때 전체공정에서 분리공정이 차지하는 경제적 비중은 매우 높게 된다. 이러한 문제점들은 식물세포를 배양하여 유용물질을 대량 생산하려는데 있어서 결정적인 장애요소다. 그러므로 이러한 문제점을 최소화하기 위해 식물세포 배양시 elicitor를 처리(1)하거나, polymeric resins(2), activated charcoal(3), silicon fluid(4)와 organic solvents(5)를 이용하는 여러 가지 방법이 연구되었고, 실제로 이들 방법은 식물세포 배양으로부터 2차 대사물질의 생산을 효율적으로 하는데 이용되고 있다. 그러나 이들 방법은 세포자체에 손상을 주거나 인체에 유해하여 2차적 처리를 필요로 하므로 보다 나은 새로운 방법의 모색이 필요하다고 인식되어 왔다. 캘리포니아 양귀비(*Eschscholtzia Californica*) 세포는 sanguinarine, chelirubine, chelerythrine과 macarpine 등과 같은 benzophenanthridine alkaloids을 축적하는 것으로 보고되어 있다(6). 이는 최근 들어 치과 의료용 특히 충치 예방용으로 많은 관심을 모으고 있다. 따라서 이러한 benzophenanthridine alkaloids을 양귀비 식물 callus나 혹은 현탁배양을 통하여 생산하려는 연구가 보고되고 있다.

본 연구에서는 식물세포 밖으로 배출된 2차 대사물질을 나중에 분리가 쉬운 생물고분자 즉 cyclodextrin을 이용하여 신속히 포획하여, 그 2차 대사물질의 안정성을 높임과 동시에, 수용액상에서 용해도가 낮아 저농도로 존재하는 2차 대사물질의 생산수율을 증가시켜 bioreactor내에서 생산과 분리를 동시에 수행할 수 있는 공정을 개발하고자 하였다.

Cyclodextrin은 6~12개의 glucose 분자가  $\alpha$ -1, 4 glucoside 결합을 이루어 환상으로 결합한 비환원성 maltooligo당으로 녹말을 발효시켜 얻을 수 있는 물질로 인체에 무해하다. Fig. 1의 분자구조 model에 도시된 바와 같이, cyclodextrin은 glucose unit의 수가 6개인  $\alpha$ -cyclodextrin, 7개인  $\beta$ -cyclodextrin 및 8개인  $\gamma$ -cyclodextrin으로 나누어지며(7, 8), 이들은 분자구조상 공동경이 작은쪽에 1급

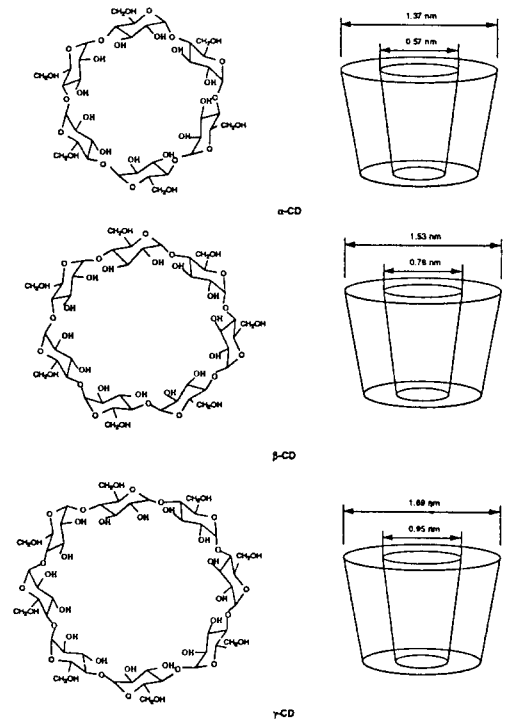


Fig. 1. Chemical structure and molecular dimensions of  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -cyclodextrin[7].

수산기가 있고 공동경이 큰쪽에는 2급 수산기가 배열하여 공동외부와 입구 부근은 친수성이 풍부하다. 한편 공동내부는 CH 결합과 glucoside의 에테르 결합으로 되어 dioxane과 유사한 소수적인 환경을 만든다. 즉 cyclodextrin은 친수성과 소수성을 동시에 가지며 분자중앙에 소수성 cavity를 갖는 특성이 있다(9). Cyclodextrin의 각 동족체는 각각 다른 internal size을 가지고 있으며, 물리화학적 성질과 포집 특성이 약간씩 차이가 있다(7, 8).

Fig. 2에서와 같이 cyclodextrin은 우리가 관심있는 식물세포 2차 대사물질을 그 cavity 안에 포획하여 포집화합물(inclusion complex)을 형성하게 되는데, 이때 포획되는 guest 분자는 화학적 요인뿐만 아니라 기하학적인 분자구조와 cyclodextrin cavity의 internal size에 따라 선택되어진다(7). Cyclodextrin과 guest 분자와의 complex 형성 mechanism은 아직 정확히 구명이 되고 있지 않지만 cyclodextrin과 guest는 몰비로 대략 1:1의 inclusion body를 형성하는 것으로 알려져 있으며, 따라

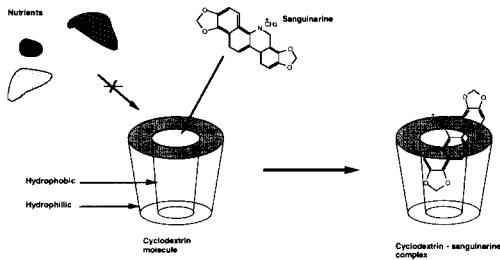


Fig. 2. Schematic representation of the cyclodextrin inclusion complex formation.

서 현탁 배양액에서 유용 2차 대사물 생산은 cyclodextrin의 물에 대한 용해도 이상을 넘을 수가 없게 됨을 인식할 필요가 있다. Cyclodextrin은 약 20g/L 이상의 비교적 높은 용해도를 가지는 것으로 알려져 있다.

Cyclodextrin은 guest 분자를 포획하여 용해도를 높이는 한편 방향성을 가진 분자들과 complex을 이루어 오랜동안 방치하여도 그 성분을 저장하는 장점을 가지고 있다. Szejtli 등은(9) vanillin-glucose 혼합물과 vanillin-cyclodextrin complex를 열려진 petridish에 넣고 240일 후에 비교해 본 결과, vanillin-glucose 혼합물에서는 vanillin을 검출할 수가 없었다. 그에 반하여 vanillin-cyclodextrin complex에서는 처음의 약 20%만이 감소했음을 알 수 있었다. 따라서 cyclodextrin complex는 guest 분자의 안정성 증대의 역할을 함을 알 수 있다.

Cyclodextrin의 포접작용에 의해 휘발성 물질의 안정화, 산화 광분해물질의 보호, 용해도 향상, 유화 작용 등과 같은 물성 개선 효과가 발현되며 이로 인한 cyclodextrin의 응용의 예는 의약품 formulation, 식품첨가제, 화장품 첨가제 등 다른 많은 분야에서 주목되고 있다(11). 대부분의 경우 cyclodextrin에 의한 여러 guest 분자의 포접은 수용액상에서 포접되지 않은 분자의 농도를 감소시키는 동시에 guest 분자의 총 용해도를 증대시키는 역할을 한다. 따라서 bioconversion process와 fermentation에서 용해도가 낮아 수용액상에서 생산수율이 낮았던 product를 cyclodextrin에 포접하여 수용액상에서 유지되는 화학평형을 bioconversion process가 빨리 일어나고 product의 생산이 증대되는 쪽으로 유도하는 연구가 관심을 모으고 있다(12-14).

## 재료 및 방법

### 시약

$\alpha$ -cyclodextrin,  $\beta$ -cyclodextrin과  $\gamma$ -cyclodextrin은 일본의 ENSUIKO SUGAR REFINING Co., Ltd.(Yokohama, JAPAN)에서 제공받았다. 그리고 standard용 sanguinarine은 SIGMA사(St. Louis, USA)로부터 구입하였고, HPLC 분석용 ion-pairing agent인 TBA(Tetrabutylammonium Phosphate)는 Aldrich사에서 구입하였다.

### Cell cultures

California 양귀비 세포배양은 hormone으로는 5mM 2,4-D와 탄소원으로는 30g/L의 glucose가 첨가된 M & S 기본배지와 hormone으로는 5mM 2,4-D, Kinetin 0.5mM과 탄소원으로는 sucrose 20g/L가 첨가된 B5 배지에서 계대배양하였다. M & S 배지의 pH는 5.6으로 조정하였고, B5배지의 pH는 5.8로 조정하였다. 현탁 배양은 100mL 배지가 든 250mL 삼각플라스크에서 7일 간격으로 세포와 배지의 비율을 1:3으로 하여 계대배양하였고, 고체 배양은 20mL 배지가 들어 있는 petridish에서 25일 간격으로 계대배양하였다. 이때 배양온도는 25℃로 유지하였고, shaker의 rpm은 120rpm으로 하였다.

### 삼각플라스크에서의 회분배양 실험

접종세포간의 이질성을 피하기 위해 250mL 삼각플라스크에서 배양중인 세포를 멸균된 500mL 삼각플라스크에 고무 섞은 후, 약한 진공하에서 여과하여 40mL 배지가 든 100mL 삼각플라스크에 fresh cell weight로 3.5g씩 접종하였다. 이때 배지내에는 cyclodextrin을 0%~2.0%(w/v)까지 멸균하기 전에 각각 넣어 준비하였다.

### Fresh cell weight와 dry cell weight 측정방법

Fresh cell weight의 측정은 배양세포를 Whatman No. 1 여과지를 이용하여 약한 진공하에서 Buchner 깔때기로 여과한 후, 다시 세포를 증류수로 세척하여 더 이상의 물이 떨어지지 않을 때까지 여과한다. 그 다음 미리 무게를 측정해 놓은 알루미늄 용기에 가능한 빨리 옮겨 무게를 측정한다. Dry cell weight의 측정은 fresh cell weight이 결정된 후, 60℃ 오븐에서 일정한 무게에 도달할 때까지 건조시킨 후 측정하였다.

### Alkaloid의 추출 및 분석

세포와 배지를 Whatman No. 1 filter paper로 여과하여 각각을 모아 세포내·외 alkaloid 분석에 이용하였다. 세포내 alkaloid는 fresh cell 1g을 취하여 HPLC용 methanol 5mL에 넣고 상온에서 20분간 sonication하여 추출하였다. 그리고 모든 sample은 분석전에 0.45 $\mu$ m membrane filter로 여과 후 HPLC에 10 $\mu$ L의 용액을 주입하였다. Alkaloid의 분석은 HPLC로 하였다. 분석조건은 UV detector (280nm)와 column은 prefilter가 달려 있는 supelcosil-18-DB(4.6mm $\times$ 15cm, 5 $\mu$ m)로 하였고, 이동상은 acetonitrile과 물을 35:65로 유지하여 0.8mL/min으로 흘려주었다. 이때 이동상 물에는 1mM TBA와 pH를 2로 조정하기 위하여 인산을 넣었다.

### Inclusion complex의 분석

배지의 수용액상에 inclusion complex 형태로 존재하는 alkaloids의 분석은 chloroform을 첨가하여 공동내의 guest 분자와 유기용매 사이의 경쟁포집 방법(competitive inclusion method)(7)을 이용하여 추출하였다. 이때 추출된 alkaloids는 위의 HPLC 분석조건과 동일하게 하여 분석하였고, cyclodextrin 분석은 HPLC로 다음의 조건하에서 행하였다. Detection은 RI detector로, column은 supelcosil LC-NH<sub>2</sub>(Supelco, PA. USA, 5 $\mu$ m, 4.6mm $\times$ 25cm)를 사용하였고 이동상은 acetonitrile과 물을 65:35로 유지하여 2.0mL/min으로 흘려 주었다.

### Inclusion complex의 확인

Inclusion complex의 확인은 UV/Vis. spectrophotometer, IR, DSC, X-ray diffractometer(7) 등으로 가능하며, 그 중 수용액상의 inclusion complex의 확인은 spectrophotometer법이 전형적인 방법이므로 UV/Vis. spectrophotometer(HP 8452)로 UV absorption의 변화에 의해 관찰하였다.

## 결과 및 고찰

Solid culture에서의 alkaloids 생산에  $\beta$ -cyclodextrin의 영향

Table 1에서 보여지듯이, 고체 배지의 cell에  $\beta$ -cyclodextrin(1% w/v) 첨가는 첨가하지 않았을 때보다 최고 40배 정도 sanguinarine의 생산성을 증가시켰다. 이것은 배지에  $\beta$ -cyclodextrin(1% w/v)

Table 1. The effect of  $\beta$ -cyclodextrin( $\beta$ -CyD) on sanguinarine production from solid culture of California poppy.(M & S)

Cyclodextrin concentration	Sanguinarine(mg/g of DCW)
$\beta$ -CyD 0%	0.098
$\beta$ -CyD 1% (A)	3.94
$\beta$ -CyD 1% (B)	1.69

A: 1% of  $\beta$ -CyD was included in the soli+d medium.

B: 1% of  $\beta$ -CyD was spread onto the solid medium.

를 멸균하기 전에 포함시켜 첨가하였을 때이고, 고체 배지에 cell을 접종한 후 분말의 형태로  $\beta$ -cyclodextrin을 살포하였을 경우에는 약 17배 정도 sanguinarine의 생산이 증가하였다. 이때 Table 1의 (A)의 경우가 (B)의 경우보다 훨씬 효과적인 생산성의 증대를 가져왔는데 이는 매우 소수성인 alkaloid가 세포에서 생산된 직후 바로  $\beta$ -cyclodextrin에 의해 포획될 때 세포와  $\beta$ -cyclodextrin간의 유효 접촉면적의 영향이거나 세포가 생산하는 alkaloid와  $\beta$ -cyclodextrin과의 inclusion complex 형성에 물의 존재 여부가 중요한 역할을 한 것이 아닌가 판단되어진다. Saenger(15)와 Manor(6)의 cyclodextrin의 X선 구조해석에 의하면 공동내에서 2분자의 물이 서로 수소결합을 하고 양끝은 2개의 glucose의 C-OH기와 수소결합을 하고 있다. 이때 물분자와 결합한 C-OH기는 다른 4개의 C-OH와는 달리 에너지적으로 불안정한 상태에 있다. 수용액 중에서도 cyclodextrin은 같은 방법으로 수소결합을 형성하여 왜곡이 생겨 비대칭 구조를 취하는 것으로 추정되는데 물 이외에 guest 분자가 포집되면 이 비대칭성이 해소되어 C-OH기는 안정화가 된다고 보고하였다. 따라서 포집현상의 중요 driving force중의 하나는 high energy water로 불리우는 cyclodextrin 공동내의 물분자와 guest 분자와의 교체에 의한 것으로 cyclodextrin 환상의 대칭성의 개선으로 생각되어진다. Takeshi 등(17, 18)은 Inclusion complex 형성에 물의 영향에 대해서 연구한 결과 물의 존재 없이는 inclusion complex의 형성이 어렵다고 보고하였다.  $\beta$ -cyclodextrin은 다당류의 생체 고분자이므로 세포벽에의 elicitor 역할을 해줌으로 phytoalexin의 production을 증대시킬 수 있는 가능성이 충분히 있다. 그러므로 이에 대한 구체적인 검증은 실험되어야 한다고 판단된다.

Fig. 3은 고체 배지에  $\beta$ -cyclodextrin을 첨가하였

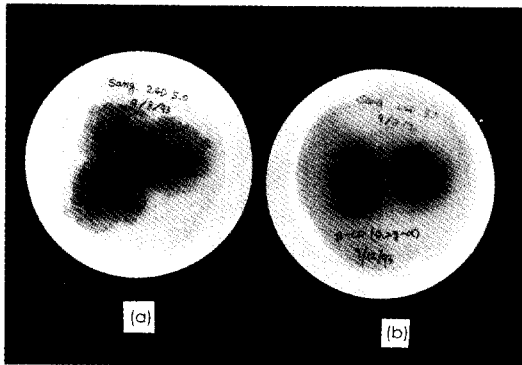


Fig. 3. The photographs of 40 day old callus cultures of California poppy on solid medium. (a) in the absence of  $\beta$ -CyD (b) in the presence of  $\beta$ -CyD

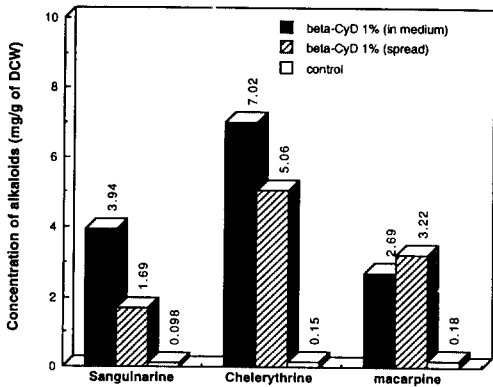


Fig. 4. The effect of  $\beta$ -cyclodextrin on the alkaloids production in the solid culture of California poppy.(M & S medium)  
 ■ : 1% of  $\beta$ -CyD was included in the solid medium  
 ▨ : 1% of  $\beta$ -CyD was spread onto the solid medium

을 때와 첨가하지 않았을 때의 모습을 비교한 사진이다. 사진에서 볼 수 있듯이 cyclodextrin을 첨가하였을 때와 첨가하지 않았을 때 세포 주위의 배지의 색이 많은 차이가 있었다. Benzophenanthridine alkaloids의 생성시 culture는 진한 붉은색을 띠며 이는 macarpine의 색깔이 대표적으로 나타내지는 결과이다. 위의 사진의 세포를 HPLC로 분석하여 Table 1과 Fig. 4의 결과를 얻었다. 이 사진은  $\beta$ -

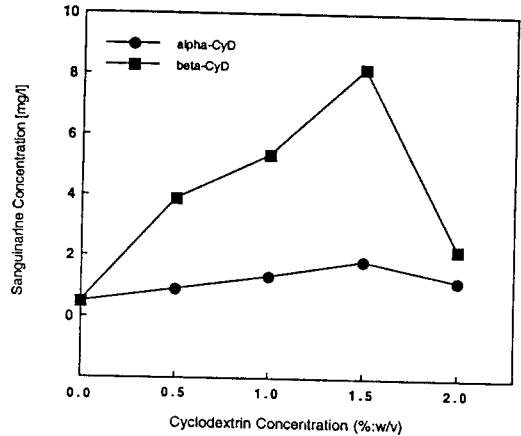


Fig. 5. The effect of  $\alpha$ -cyclodextrin and  $\beta$ -cyclodextrin on sanguinarine production in the suspension cultures of California poppy. (Low producing medium : M & S)

cyclodextrin이 benzophenanthridine alkaloids 생산 증대에 미치는 영향을 잘 말해주는 좋은 증거 자료이다.

Suspension culture에서 cyclodextrin의 영향

일반적으로 식물세포 배양계에 exogenous한 물질의 첨가에 의한 2차 대사물의 생산성 증가 정도는 culture 주위 환경인자에 따라 현저히 달라질 수 있다. 따라서 본 실험에서는 cyclodextrin을 첨가하여 생산성 향상 증폭 정도를 조사하기 위해 양귀비 세포배양에서 benzophenanthridine alkaloid를 고농도로 생산하는 배지(high producing medium)와 저농도로 생산하는 배지(low producing medium)에서 실험을 행하였다. Suspension culture시 cell growth는 비슷하지만 alkaloid 생산을 2mg/L 이하로 하는 low producing medium(M & S)과 alkaloid 생산을 40-50mg/L 이상으로 하는 high producing medium(B5)의 두 경우에 대하여 실험하였다.

Low producing medium(M & S)에서의 영향

Fig. 5에서 보여지듯이  $\alpha$ -cyclodextrin보다는  $\beta$ -cyclodextrin이 고농도의 sanguinarine을 생산하는데 더 효과적임을 알 수 있었다. 이때  $\beta$ -cyclodextrin의 최고 효과적인 농도는 현탁배양배지의 1.5% (w/v)부근에서였고, sanguinarine의 생산량은 세포 내에서 약 6.7배 증가했으며, 세포외에서 약 20배

증가했음을 알 수 있었다. 이는 배지에 첨가된 cyclodextrin이 세포로부터 배출된 alkaloid의 농도를 낮춤으로서 세포와 배지간에 유지되는 화학적 평형을 세포내에서 alkaloid의 생산이 촉진되는 방향으로 유도하여 alkaloid의 생산이 증가된 것이라 사료된다. XAD-2, 4, 7 등 ion exchange resin은 berberine 및 기타 다른 alkaloid의 선택적 흡수가 가능하여 배지에 유출된 alkaloid의 분리정제에 이용되었다(19). 특히 berberine의 경우 XAD-2 resin의 첨가에 의해 생산량이 증대되었다고 보고된 바 있다. 그러나 XAD-2 resin을 1.5g/30mL 이상으로 첨가할 경우 배지중으로 유출된 berberine뿐만 아니라 세포생육에 필요한 물질까지도 흡수하여 세포생육과 berberine 생산을 저하시켰다고 보고되었다. Amberlite XAD-7이 Indole alkaloid의 생산에 사용되었고, cinchona에서는 안트라퀴논의 생산이 1mg/L에서 20mg/L로 증가하였다(20). 흡수제 첨가효과는 *Nicotina tabacum* 세포배양에서 XAD-4 resin을 4~12.5%까지 첨가하였을 때 chlorogenic acid를 20% 정도 증가시켰으며(21), charcoal 첨가로 coniferyl aldehyde를 20~60배 생산한 경우가 보고된 바 있다(22). 흡수제 첨가방법에 의한 2차 대사물의 회수는 2차적 처리를 필요로 하기 때문에 차후 세포생육을 촉진하고 생산된 물질의 간편한 수거를 위하여 흡수제 첨가방법을 세포 생육주기별 투여효과, 흡수제의 종류 처리방법 등을 달리하여 다각적이고 효율적인 이용방법이 개발되어야 한다. 이러한 면에서의 cyclodextrin은 2차 대사물의 생산을 증대하는 적절한 흡착제로서의 기능과 분리방법이 용이하므로 앞으로 더 많은 연구가 이루어져야 한다고 생각된다.

$\beta$ -cyclodextrin을 0%~1.5%까지 증가시켜 첨가 해주었을 경우 suspension의 색이 점차로 더 진한 붉은색을 나타내었고,  $\beta$ -cyclodextrin가 2%인 경우에는 1%와 1.5%보다 여린 붉은색을 나타내었다. Fig. 5에서 알 수 있듯이  $\alpha$ -,  $\beta$ -cyclodextrin 공히 cyclodextrin의 농도가 현탁배양배지의 1.5% (w/v)에서 최고의 생산성 증대를 보이는 것으로 보아 suspension culture시 cyclodextrin의 최적 농도가 존재하는 것을 알 수 있었다. Cyclodextrin을 이용한 용해도의 증대는 각각의 guest 분자마다 그 한계를 갖고 있다. 즉 용해평형에 도달하게 되는데 Higuchi와 Kristiansen(23)에 의하면 복합체 고유의 용해도는 크게 두 가지로 분류될 수 있다. 그 한 가지는 용해곡선이 상승곡선을 보여주는 상승형과 다른

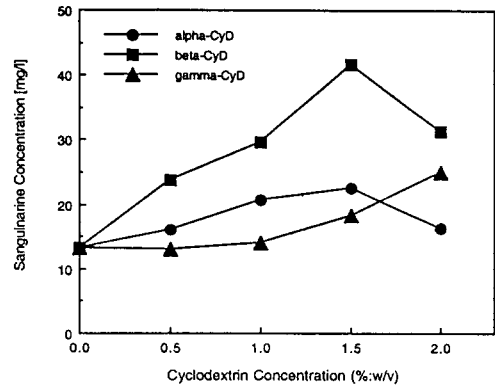


Fig. 6. The effect of  $\alpha$ -cyclodextrin,  $\beta$ -cyclodextrin and  $\gamma$ -cyclodextrin on sanguinarine production in the suspension cultures of California poppy. (High producing medium: B5)

한 가지 유형은 상승하면서 평형에 도달되었다가 다시 하강하는 상승하강형이다. 대부분의 상승형은 cavity에 guest 분자의 포접이 불완전할 때 나타나고 cavity에 guest 분자가 잘 fit될 때는 상승하강형을 나타낸다고 보고하고 있다. 따라서 세포배양시  $\beta$ -cyclodextrin의 optimum concentration의 존재는 benzophenanthridine alkaloid가 포접체로서 용해평형에서 오는 용해도 증대의 한계로 설명할 수도 있다. 또한 현탁배양에  $\beta$ -cyclodextrin 첨가시  $\beta$ -cyclodextrin 농도에 따라 상승하강형의 alkaloid 생산성 증대를 보이는 것을 볼 때 alkaloid가  $\beta$ -cyclodextrin의 cavity 안에 잘맞은 안정한 포접화합물의 형태로 배지내에 존재하는 것을 추측할 수 있었다.

#### High producing medium(B5)에서의 영향

Fig. 6에서 나타나 있듯이  $\alpha$ -,  $\gamma$ -cyclodextrin보다는  $\beta$ -cyclodextrin이 sanguinarine 생산 증대에 더욱 효과적이었으며, 이때 control( $\beta$ -cyclodextrin 무첨가)보다  $\beta$ -cyclodextrin의 농도가 현탁배양배지의 1.5% (w/v)에서 최고 3.2배의 증가를 나타냈다. 이때에도 역시 최적 농도가 존재하였는데, M & S에서와 마찬가지로 현탁배양배지의 1.5% (w/v) 부근에서였다.

Cyclodextrin의 각 동족체는 각각의 다른 internal size를 갖는데 이로 인해 물리화학적 성질과 포접 특성의 차이가 있어 포획되는 guest 분자를 선택

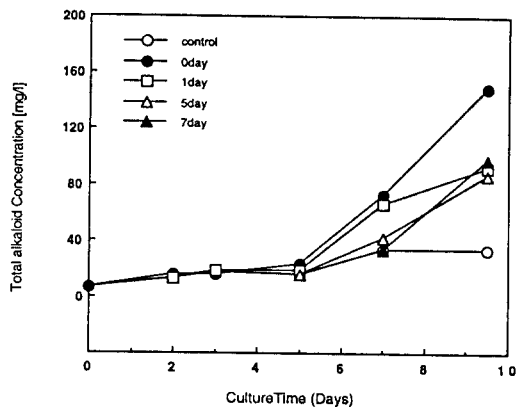


Fig. 7. The effect of  $\beta$ -cyclodextrin (1.5%) added at various culture times on total alkaloid production in the suspension cultures of California poppy.(B5 medium)

할 수 있다. Suspension culture에서  $\alpha$ -와  $\gamma$ -cyclodextrin보다  $\beta$ -cyclodextrin의 첨가에 의해 alkaloid 생산이 현격히 증가되었다는 것은  $\beta$ -cyclodextrin이 inclusion complex 형성에 적합한 internal size 및 물리화학적 성질을 가지고 있고, 또한 cyclodextrin의 용해도를 보면  $\beta$ -cyclodextrin이  $\alpha$ -와  $\gamma$ -cyclodextrin에 비해 소수성이 크기 때문인 것으로도 설명할 수 있다.

$\beta$ -cyclodextrin의 첨가시기에 대한 영향

Fig. 7에 나타나 있듯이  $\beta$ -cyclodextrin의 첨가시기는 배양초기 즉 배양시작과 함께 넣어 주는 것이 생산성 증대에는 더욱 효과적인 결과를 가져왔다. 이때 control보다 약 4.8배의 alkaloid 생산 증대를 가져왔다. 이는 cyclodextrin이 배지내의 수용액상에 존재하면서 세포에서 생산되는 alkaloid를 신속히 포획하여 세포가 인식할 수 있는 세포내·외의 alkaloid 양이 감소되어 생산성이 증대되는 영향을 주는 것으로 추론된다. Byun 등(24)은 캘리포니아 양귀비 세포배양에 elicitor를 처리하여 alkaloid의 생산을 증대시켰는데 이때 elicitor의 첨가시기는 exponential phase 말기 또는 stationary phase 초기에 처리하는 것이 2차 대사활성을 유도하는데 좋다고 보고하였다.

Cyclodextrin이 세포성장애 미치는 영향

Fig. 8에서 보여지듯이  $\beta$ -cyclodextrin을 첨가하

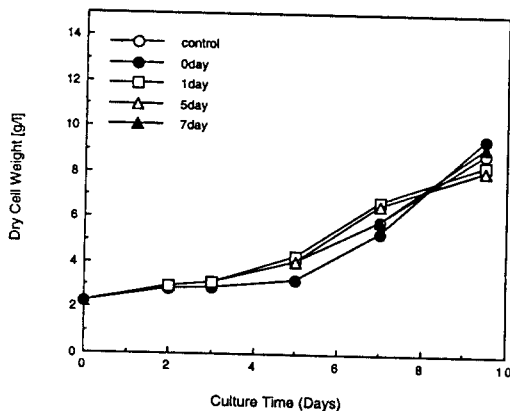


Fig. 8. The effect of  $\beta$ -cyclodextrin (1.5%) added at various culture times on cell growth in the suspension cultures of California poppy.(B5 medium)

였을 때와 첨가하지 않았을 때 두 경우 모두 cell growth가 비슷한 경향을 보였다. 이로써  $\beta$ -cyclodextrin은 세포성장애 해를 주지않음을 알 수 있었다. Cyclodextrin은 전분의 분해 물질로 인체에 무해하여 의약품제제에도 많이 응용되고 있다(7).

$\beta$ -cyclodextrin 첨가에 의한 production pattern의 변화

High producing medium(B5)의 현탁배양에  $\beta$ -cyclodextrin을 첨가하여 배양한 결과 생산 pattern이 변하였다. Control의 경우 세포외보다 세포내에 alkaloid를 생산하여 축적하는 식물세포의 일반적인 경향을 보이는 반면  $\beta$ -cyclodextrin 처리를 한 경우에는 세포내·외 모두 alkaloid 생산을 증가시켰을 뿐만 아니라, 오히려 세포내보다 세포외에서 alkaloid를 생산하는 것으로 보아  $\beta$ -cyclodextrin이 배지의 수용액내에서 세포가 생산하는 alkaloid를 신속히 포획하여 product 배출을 촉진하는 역할을 하는 것이라 추론된다. Fig. 9에서  $\beta$ -cyclodextrin 처리의 경우 alkaloid 총생산량의 70%가 세포외에 존재하는 것을 알 수 있었다. 2차 대사물질을 가장 효과적으로 생산할 수 있는 세포의 물질 축적형태는 배지속에 방출하는 것이다. 이런 것은 세포를 살아 있는 상태로 유지하면서 배지속의 물질만 회수할 수 있기 때문이다. 그러나 이보다는 세포 내부나 세포벽에 머물러 있는 경우가 더 많으므로 이들을 끌어내기 위한 기능을 가진 polymeric resins(2, 25), acti-

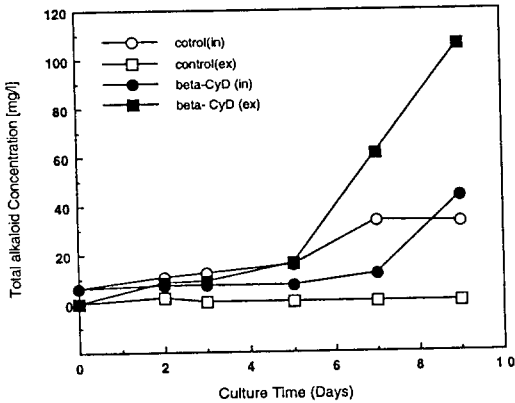


Fig. 9. Production patterns of alkaloids in the suspension cultures of California poppy when treated with  $\beta$ -cyclodextrin.(High producing medium : B5)

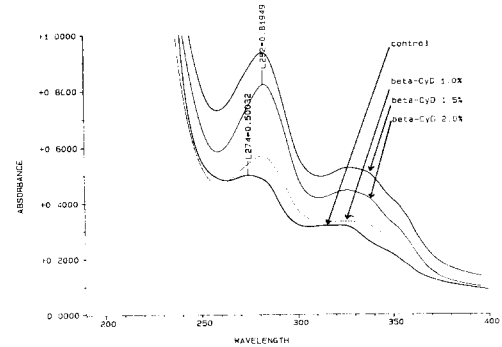


Fig. 10. The UV spectrum of medium of different concentrations of  $\beta$ -cyclodextrin in the suspension cultures of California poppy. (B5 medium)

vated charcoal(3), silicon fluid(4)와 organic solvents(5)와 같은 화학물질을 배지에 넣거나(26) 전기적인 펄스를 가하여 세포의 배출을 촉진한 연구들이 보고되었다. 그러나 유용물질들은 세포밖으로 빠져나오지만 이때 세포에 손상을 주기 때문에 세포의 생존율이 떨어진다는 것이 일반적인 결과이다. 또한 배지속에 배출된 2차 대사물질들은 효소반응에 의해서 또는 기타 원인에 의해서 분해될 수 있으므로 이것을 방지하기 위해서는 생산되는 대로 bulk phase로부터 계속 회수함으로써 세포의 생합성이 더 촉진될 수 있고 세포 주변에 있을 수 있는 세포유해 물질을 제거할 수 있다.

본 실험의 결과 현탁배양에  $\beta$ -cyclodextrin의 이용은 세포에 손상을 주지 않으면서 세포내에 축적된 2차 대사물질을 배지속으로의 배출을 촉진할 수 있음을 관찰하였다.

Inclusion complex의 확인

수용액상에서 inclusion complex의 해명방법의 하나인 UV absorbance를 측정함으로써 확인하였다. Fig. 10에서와 같이 현탁배양의 수용액을 UV로 측정할 결과 control( $\beta$ -cyclodextrin 첨가하지 않음)의 경우 maximum absorbance가 274nm에서 나타났는데 비해  $\beta$ -cyclodextrin의 첨가의 경우 maximum absorbance가 282nm로 shift되었다. 이는 UV에 의한 전형적인 방법의 결과와 일치하므로, 현탁배양의 수용액상에 inclusion complex가 존재함을

알 수 있었다. Cyclodextrin의 inclusion complex에 의한 UV maximum absorbance shift의 예로는 mefenamic acid(27)와 salicylic acid, vitamin K3와 vitamin D3(7) 등의 경우가 보고되어 있다. 이러한 UV maximum absorbance의 shift는 cyclodextrin cavity 안에 excitable electrons의 partial sheiding 역할에 기인된 것이라 설명할 수 있다.

요 약

본 연구에서는, 최근 들어 관심의 대상이 되어 의약품 산업에 응용의 수가 늘고 있는 cyclodextrin을 이용하여 세포밖으로 배출된 식물세포 2차 대사물질을 신속히 포획하여 생산수율을 증대시키고자 하였다. 실험결과 양귀비 현탁배양에서  $\alpha$ -,  $\gamma$ -cyclodextrin보다는  $\beta$ -cyclodextrin이 benzophenanthridine alkaloid를 생산하는데 더 효과적임을 알았다. 이때  $\beta$ -cyclodextrin의 optimum concentration이 존재하였는데, 그 농도는 현탁배양배지의 1.5% (w/v) 부근에서였다. 고체 배지에서  $\beta$ -cyclodextrin의 첨가는 sanguinarine의 생산성을 control의 경우보다 약 40배(포함), 약 17배(살포) 정도 증가시켰다.  $\beta$ -cyclodextrin은 현탁배양 배지의 수용액상에서 세포외로 배출된 alkaloid를 신속히 포획하여 inclusion complex를 형성함으로써 product의 배출을 촉진하여 결과적으로, product pattern을 변화시켜 줌으로써 생산과 분리가 동시에 이루어질 수 있는 연속공



정의 가능성을 확인시켜주었다. 또한  $\beta$ -cyclodextrin 1.5% (w/v)을 첨가시기를 달리하여 실험한 결과 배양초기에 넣어주는 것이 효과적이었으며, 이때  $\beta$ -cyclodextrin은 세포 성장에 미치는 영향이 없음을 확인하였다.  $\beta$ -cyclodextrin에 의한 benzophenanthridine alkaloid의 엄청난 생산 증대 효과는 1) Inclusion complex 형성에 의한 안정성 증대뿐만 아니라 2) elicitor로서의 역할 등의 복합적인 요인을 생각해 볼 수 있는데 2)의 경우에 대한 실험을 세포와  $\beta$ -cyclodextrin간의 직접적인 접촉을 시키지 않고 해본 결과 미세한 영향을 나타내었으므로 elicitation의 경우를 완전히 배제한다고 할 수 없었다. 그러나 UV에 의한 inclusion complex의 확인이 1)의 경우를 확인하여 주었으므로 본 실험에서  $\beta$ -cyclodextrin의 역할은 inclusion complex에 의한 생산성 증대라 할 수 있다.

### 감 사

본 연구는 한국학술진흥재단의 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

### 참 고 문 헌

1. S. D. Cline and J. C. armine(1988), *Plant Physiol.*, **86**, 0161.
2. R. D. Williams, N. Chauret, C. Bedard, and J. Archambault(1992), *Biotech. Bioeng.*, **40**(8), 971.
3. H. Fukui, N. Yoshikawa, and M. Tabata (1984), *Phytochem.*, **23**, 301.
4. S. Y. Byun, H. Pedersen, and C. K. Chin (1990), *Phytochem.*, **29**(10), 3135.
5. H. Deno, C. Suga, T. Morimoto, and Y. Fujita (1987), *Plant Cell Reports.*, **6**, 197.
6. J. Berlin, E. Forche, V. Wray, J. Hammer, and W. Hosel(1983), *Z. Naturforsch*, **38**, 346.
7. J. Szejtli(1982), *Cyclodextrins and Their Inclusion complexes*, Akademiai Kiado, Budapest, 177.
8. W. Saenger(1980), *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **19**, 344.
9. J. Szejtli, M. Szejtli, and L. Szent(1978), *Hung. Pat.* **180**, 577(C. A. 95:167384).
10. G. H. Cho and S. C. Park(1994), *Korea Pat. appl. No.* 26,350.
11. I. Habon, A. Stadler-Szoke, and J. Szejtli (1985), *Magyar Kemikusok Lapja.*, **60**, 231.
12. R. Bar(1983), *Trends in Biotechnology*, **1**(1), 16.
13. H. Enei, H. Matsui, H. Nakazawa, S. Okumura, and H. Yamada(1973), *Agric. Biol. Chem.*, **37**, 493.
14. H. Sawada, T. Sazuki, S. Akiyama, and Y. Nakao(1987), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **26**, 522.
15. W. Saenger, M. Noltemeyer, P. C. Hingerty, and B. Klar(1976), *Bioorg. Chem.*, **5**, 187.
16. P. C. Manor and W. Saenger(1974), *J. Am. Chem. Soc.*, **96**, 3630.
17. T. Furuta, H. Yoshii, A. Miyamoto, A. Yasunishi, and H. Hirano(1993), *Supramolecular Chem.*, **1**, 321.
18. T. Furuta, H. Yoshii, A. Miyamoto, A. Yasunishi, and H. Hirano(1991), *Kagaku Kougaku Symposium series*, **27**, 28.
19. K. Nakagawa, A. Konagai, H. Fukui, and M. Tabata(1984), *Plant Cell Rep.*, **3**, 154.
20. P. E. Brodelius(1990), *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology*, 567.
21. R. Maisch, B. Knoop, and R. Beiderbeck (1986), *Z. Naturforsch, C. Biossi*, **41**, 486.
22. B. Knoop and R. Beiderbeck(1983), *Z. Naturforsch, C. Biosci.*, **38**, 484.
23. T. Higuchi and H. Kristiansen(1970), *J. Pharm. Sci.*, **59**, 1601.
24. S. Y. Byun, H. Pedersen, and C. K. Chin (1990), *Biochemical Engineering VI*, **589**, 54.
25. M. Asada and M. L. Shuler(1989), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **30**, 475.
26. P. Brodelius(1988), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **27**, 561.
27. K. Ikeda, K. Uekama, and M. Otagir(1975), *Chem. Pharm Bull.*, **23**, 201.